



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0082

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

EINFLUSS VON FOLLIKELFLÜSSIGKEIT UND
SEMINALPLASMA VERSCHIEDENER SPEZIES AUF DIE
FSH- UND LH-SEKRETION BOVINER UND OVINER
HYPOPHYSENVORDERLAPPENZELLKULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

KORNELIA BUS

aus

Kusel

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreis	2
2.2. Inhibin	5
2.2.1. Vorkommen, Syntheseort, Wirkungsort	8
2.2.2. Bioassays für Inhibin	12
2.2.2.1. In vivo-Methoden	13
2.2.2.2. In vitro-Methoden	14
2.2.3. Physiologische Bedeutung von Inhibin	16
2.2.4. Inhibinaktivität in der Follikelflüssigkeit	18
2.2.4.1. Die bovine Follikelflüssigkeit (bFF)	19
2.2.4.2. Die equine Follikelflüssigkeit (eFF)	23
2.2.4.3. Die porcine Follikelflüssigkeit (pFF)	24
2.2.4.4. Die ovine Follikelflüssigkeit (oFF)	26
2.2.4.5. Die humane Follikelflüssigkeit (hFF)	27
2.2.5. Inhibinaktivität im Seminalplasma	28
2.2.6. Steroidhormone und Inhibinaktivität	30
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	33
3.1. Die bovine HVL-Zellkultur	33
3.1.1. Material	33
3.1.1.1. Hypophysen	33
3.1.1.2. Follikelflüssigkeit	34
3.1.1.3. Seminalplasma	35
3.1.2. Methode	35
3.1.2.1. Extraktion der Steroidhormone	35
3.1.2.2. Zellkultur	36
3.1.2.2.1. Gewinnung der Zellen	36

	Seite
3.1.2.2.2. Vitalfärbung und Zelldichte	37
3.1.2.2.3. Aussaat in Gewebekulturschalen	39
3.1.2.2.4. Vorinkubation und Kulturwachstum	39
3.1.2.2.5. Inkubation	40
3.1.2.2.6. Stimulation	40
3.1.2.3. Hormonbestimmungen	42
3.2. Die ovine HVL-Zellkultur	43
3.2.1. Material	43
3.2.1.1. Medien und Lösungen	43
3.2.1.2. Hypophysen	45
3.2.1.3. Follikelflüssigkeit	46
3.2.1.4. Seminalplasma	46
3.2.2. Methode	46
3.2.2.1. Extraktion der Steroidhormone	46
3.2.2.2. Zellkultur	46
3.2.2.2.1. Mechanische Zerkleinerung der Hypophysen	47
3.2.2.2.2. Enzymatische Dispergierung	47
3.2.2.2.3. Vitalfärbung und Zelldichte	48
3.2.2.2.4. Aussaat in Gewebekulturschalen	48
3.2.2.2.5. Vorinkubation und Kulturwachstum	49
3.2.2.2.6. Inkubation und Stimulation	49
3.2.2.3. Hormonbestimmungen	51
3.3. Statistik	51
3.4. Ergebnisse	52
3.4.1. Steroidgehalt der Testsubstanzen vor und nach der Kohleextraktion.	52
3.4.2. Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.	54
3.4.3. Einfluß von gereinigter bFF auf die basale und GnRH-stimulierte FSH- und LH-Freisetzung boviner HVL-Zellen in vitro.	54

	Seite
3.4.4. Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.	56
3.4.5. Einfluß von Follikelflüssigkeit verschiedener Spezies auf die LH- und FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.	56
3.4.5.1. Bovine Follikelflüssigkeit	56
3.4.5.2. Equine Follikelflüssigkeit	60
3.4.5.3. Porcine Follikelflüssigkeit	66
3.4.5.4. Ovine Follikelflüssigkeit	66
3.4.5.5. Humane Follikelflüssigkeit	71
3.4.6. Einfluß von Seminalplasma verschiedener Spezies auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.	71
3.4.6.1. Bovines Seminalplasma	71
3.4.6.2. Equines Seminalplasma	76
3.4.6.3. Porcines Seminalplasma	76
3.4.6.4. Ovines Seminalplasma	76
3.4.6.5. Humanes Seminalplasma	83
4. DISKUSSION	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	104
6. SUMMARY	106
"Effects of follicular fluid and seminal plasma from various species on the FSH- and LH-release of bovine and ovine anterior pituitary cell cultures."	
7. LITERATURVERZEICHNIS	108
8. ANHANG	125

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Das Fortpflanzungsgeschehen der Säugetiere wird von einem, durch viele endogene und exogene Faktoren beeinflussten endokrinen Regelkreis gesteuert. Obwohl man in den letzten Jahrzehnten bedeutende Fortschritte in der Erforschung von Struktur und Wirkungsweise der beteiligten Hormone gemacht hat, sind viele Mechanismen nur mit Hypothesen oder gar nicht zu erklären.

So enthalten zum Beispiel die extrazelluläre Follikelflüssigkeit des Ovars und das Seminalplasma ein seit mehr als 50 Jahren bekanntes und häufig als Inhibin bezeichnetes Peptidhormon. Ihm wird ein selektiv FSH-hemmender Effekt zugesprochen. Seine Struktur und Wirkungsweise sind jedoch immer noch nicht vollständig geklärt.

Voraussetzung für einen Großteil der Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet ist die Entwicklung geeigneter Nachweismethoden. Die Verwendung von Zellkulturen als Bioassay brachte die Möglichkeit, die Versuchsbedingungen weitgehend zu standardisieren und Ausschnitte eines komplexen Geschehens isoliert zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Hypophysenvorderlappen-Zellkulturen von Schaf und Rind der Einfluß von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma verschiedener Tierarten und des Menschen auf die Gonadotropinsekretion vergleichend überprüft.



2. LITERATUR

2.1. Der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreis

Der endokrine Regelkreis entsteht durch das Zusammenwirken verschiedener Hormone mit unterschiedlichen Syntheseorten.

Das im Hypothalamus des Gehirnes gebildete Gonadotropin-Releasing-Hormon GnRH gelangt auf dem Blutweg über das Pfortadersystem des Hypophysenstieles in den Hypophysenvorderlappen und steuert hier die Freisetzung der Gonadotropine. Diese regulieren in den Gonaden die Bildung der Sexualsteroidoide.

Die Sexualsteroidoide werden in die Blutbahn abgegeben und bewirken so am Hypothalamus und an der Hypophyse bei einem hohen Blutspiegel eine Hemmung und bei einem niedrigen Blutspiegel eine Stimulation der GnRH- und/oder Gonadotropinsekretion. Diesen Regulationsmechanismus bezeichnet man als negatives bzw. positives Feedback.

Ein weiterer Faktor in diesem endokrinen Regelkreis ist das selektiv FSH-hemmende Gonadenhormon Inhibin.

Das Dekapeptid GnRH gilt seit seiner Isolierung durch SCHALLY et al. (1971) als einziges hypothalamisches Regulativ sowohl für die LH- als auch für die FSH-Freisetzung aus der Hypophyse.

Das Gonadotropin Luteinisierendes Hormon (LH) agiert am Hoden an den Leydigischen Zellen. Es steigert die 3',5'AMP-Produktion, die Androgensynthese und aktiviert die Proteinkinase. Am Ovar findet LH seine Rezeptoren an den Granulosazellen, den Thekazellen und den interstitiellen Zellen (DORRINGTON und ARMSTRONG, 1979).

Im weiblichen Organismus schwankt die LH-Sekretion entsprechend dem jeweiligen Stand des Sexualzyklus. Der große, gereifte Tertiärfollikel kommt durch einen abrupten LH-Anstieg zur Ovulation. Dieser LH-Anstieg stellt sich in der Graphik der Hormonprofile als präovulatorischer Peak dar. Ob ein Peak auftritt ist abhängig von der Progesteronsekretion. Beim Schaf z.B. kommt es nicht zu einem präovulatorischen LH-Anstieg, bevor nicht die Progesteronkonzentration unter 1 ng/ml Plasma gesunken ist (HANSEL, 1973).

LH induziert die Luteinisierung der Follikelwand und die Bildung eines Corpus luteums. Die Bindung von LH an die Thekazellen des Ovars fördert die Bildung von Androstenedion und Östradiol-17 β (KOLB, 1984). Exogen zugeführtes LH verlängert den Zyklus (DONALDSON und HANSEL, 1965) und führt zum Anstieg der Progesteronkonzentration im Blutplasma bei hysterektomierten Tieren (BRUNNER et al., 1969). LH steigert die Progesteronsekretion in vivo (NISWENDER et al., 1969) und in der Luteinzellkultur (STOCK, 1984).

Es gibt Hinweise dafür, daß auch das Gonadotropin Follikelstimulierendes Hormon (FSH) an den Leydigischen Zellen des Hoden bindet und die Testosteron-induzierte LH-Stimulation steigert (ODELL et

al., 1973; SWERDLOFF und WALSH, 1973). Seine primäre Aufgabe im männlichen Organismus findet FSH jedoch zusammen mit Testosteron in den Sertoli Zellen der Tubuli seminiferi bei der endokrinen Kontrolle der Spermatogenese (MEANS et al., 1976). Dabei scheint FSH für die Entwicklung der Spermatiden zu Spermatozoen wichtig. Im Ovar kommt es in den Granulosazellen kleinerer Tertiärfollikel unter FSH-Einfluß zur Umwandlung der Androgene in Östradiol-17 β , zur Erhöhung der Zahl der LH-Rezeptoren und zur Bildung des Plasminogenaktivators. Er wandelt das Plasminogen der Follikelflüssigkeit in Plasmin um. Dieses bewirkt die Auflösung der Follikelwand bei der Ovulation.

Eine bedeutende Rolle wird dem FSH im Prozeß der Follikelreifung zugesprochen. Während die meisten Follikel einer Atresie erliegen, gelingt es nur wenigen, zu Graafschen Follikeln heranzureifen und zur Ovulation zu kommen. Der Mechanismus, der die Atresie kontrolliert, ist noch weitgehend unbekannt. HIRSHFIELD (1981) glaubt, daß der FSH-Peak im Proöstrus des Zyklus einige Follikel in der "kritischen Phase" ihrer Reifung vor der Atresie rettet, diese dann weiter wachsen und ihre Entwicklung im nächsten Zyklus beenden.

In der Lutealphase wurde nach FSH-Impulsen eine pulsatile Progesteronfreisetzung festgestellt (SCHALLENBERGER et al., 1984). Auch verstärkten Hinweise auf FSH-Rezeptoren im Gelbkörper der Anbildungsphase die Annahme, daß das FSH eine luteotrope Wirkung besitzt (MANNS und NISWENDER, 1983).

Die Erforschung der Wirkungsweisen von FSH wird durch die Problematik beim Nachweis mittels Radio-Immuno-Assay (RIA) erschwert. BOLT und ROLLINS (1983) wiesen auf die komplizierte Gewinnung der zur RIA-Durchführung notwendigen spezifischen FSH-Antiseren hin. Tiere, die gegen FSH immunisiert werden, produzieren Antiseren, die im homologen Testsystem mit LH und TSH kreuzreagieren, da diese drei Hormone in der gleichen Spezies eine gemeinsame alpha-Untereinheit besitzen. Die Verwendung eines homologen RIA-Systemes ist jedoch einem heterologen System wegen der speziesspezifischen immunologischen Unterschiede vorzuziehen, da hier die Verwendung eines Antiserums gegen die FSH- β -Untereinheit möglich ist.

2.2. Inhibin

Bereits vor mehr als 60 Jahren beobachteten MOTTRAM und CRAMER (1923) nach Bestrahlung der Hoden erwachsener Ratten eine Hypertrophie der Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL). Da histologische Untersuchungen nur Schädigungen der Tubuli seminiferi aufzeigten, folgerten sie, daß der Status des Epithels der Tubuli seminiferi die Hypophyse beeinflussen könne.

Nachdem MC CULLAGH (1932) nachgewiesen hatte, daß die Injektion eines wasserlöslichen Extraktes aus bovinem Hodengewebe das Auftreten der hypertrophen "Kastrationszellen" in der Hypophyse verhindert, postulierte er neben dem Testosteron ein zweites testikuläres Hormon, das "Inhibin".

Erst nachdem die Existenz zweier verschiedener Hypophysenhormone, nämlich FSH und LH, erkannt worden war, war es möglich, mit Hilfe der Bestimmung der im Harn enthaltenen Gonadotropine die Beziehung zwischen erhöhter Gonadotropinausscheidung und hochgradiger Hodenschädigung darzustellen.

In den siebziger Jahren konnte dann mittels Radio-Immuno-Assay gezeigt werden, daß nach der Injektion von Extrakten testikulären Ursprungs an Versuchstiere der FSH-Spiegel im peripheren Blut sank (LUGARO et al., 1974; SETCHELL und JACKS, 1974).

DE JONG und SHARP (1976) beschrieben zum ersten Mal die Existenz eines selektiv FSH-hemmenden Faktors in der Follikelflüssigkeit. Die Bezeichnung dieser FSH-suppressiven Substanz ist in der Literatur nicht einheitlich. MC CULLAGH (1932) nannte sie "Inhibin", auch heute noch der am häufigsten gebrauchte Name. SCHWARTZ und CHANNING (1977) wollten mit der Bezeichnung "Folliculostatatin" die weibliche Herkunft der von ihnen beschriebenen Substanz kennzeichnen, SAIRAM et al. (1978) sprachen vom "follicitropin-suppressing-principle". STEINBERGER und STEINBERGER (1976) wiesen die Sekretion eines FSH-hemmenden Faktors durch kultivierte Sertoli-Zellen nach und nannten ihn "Sertoli-Cell-Factor" (SCF).

Trotz vieler Veröffentlichungen über eine teilweise oder vollständig gelungene Reinigung (s. Übersicht DE JONG und ROBERTSON, 1985), ist es immer noch nicht möglich, das Inhibin chemisch eindeutig zu identifizieren und zu synthetisieren.

DE JONG und ROBERTSON (1985) weisen darauf hin, daß mehrere Stadien der Synthese, Sekretion und biologischen Aktivität von FSH empfindlich für inhibitorische Effekte sein können, ausgelöst durch Proteine unterschiedlicher Gewebe. Das Protein, das als Inhibin bezeichnet werden kann, muß unter FSH-Kontrolle von den Gonaden produziert werden und beeinflusst wahrscheinlich an der Hypophyse über einen Rezeptormechanismus die FSH-Sekretion.

RAMASHARMA et al. (1984) publizierten die Aminosäuresequenz des synthetischen Replikates eines Peptides, das sie aus humanem Seminalplasma isoliert hatten und das Inhibinaktivität zeigte. LIU et al. (1985) konnten dies in ihren Versuchen nicht bestätigen.

Die erfolgreichsten Reinigungsversuche von Inhibin gelangen mit Follikelflüssigkeit. ROBERTSON et al. (1985) fanden in der bovinen Follikelflüssigkeit (bFF) eine Inhibin-aktive Substanz mit einem Molekulargewicht (MW) von 56 Kilodalton (KD). Sie kann in zwei Untereinheiten mit MW 44 KD und 14 KD dissoziieren.

MIYAMOTO et al. (1985 a) isolierten aus porciner Follikelflüssigkeit (pFF) ein Inhibin mit einem Molekulargewicht von 32 KD. Es enthält zwei Polypeptid-Untereinheiten (MW 20 KD bzw. 13 KD), die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Schließlich berichteten LING et al. (1985) über das Inhibin aus pFF, daß es aus 2 Formen, nämlich A und B, besteht, wobei sich jede Form wiederum aus 2 Untereinheiten - alpha und beta - mit unterschiedlichem Molekulargewicht (18 KD bzw. 14 KD) zusammensetzt. Die beiden Untereinheiten sind durch Disulfid-Brücken kreuzweise verbunden.

Die A- und B-Formen unterscheiden sich in der N-terminalen Sequenz der beta-Untereinheit.

Diese Reinigungserfolge sind sicherlich ein großer Schritt hin zu einem einheitlich akzeptierten Standard für Inhibin, an dem dann die Aktivitäten der unterschiedlichen Präparationen objektiviert werden können.

2.2.1. Vorkommen, Syntheseort, Wirkungsort

Bei welchen Spezies bereits über das Vorkommen einer selektiv FSH-hemmenden Substanz berichtet wurde, ist der folgenden Tabelle (Tab. 1) zu entnehmen. Dabei sind neben der Gattung und den neueren Literaturhinweisen die Substrate aufgeführt, in denen eine Inhibinaktivität nachweisbar war.

Als Ort der Inhibinsynthese vermuteten STEINBERGER und STEINBERGER (1976) die Sertolizellen des Hodens. Sie kultivierten Ratten-HVL-Zellen im Medium von Sertolizellkulturen oder co-kultivierten sie mit Sertolizellen und erhielten im Vergleich zu den Kontrollgruppen erniedrigte FSH-Sekretionsraten. Dieser Effekt trat nicht auf, wenn man die Hypophysenzellen mit Milz- oder Nieren- oder zerstörten Sertolizellen gemeinsam züchtete. So gelten die Sertolizellen als Ort der testikulären Inhibinsynthese (s.a. DE JONG et al., 1979 b).

Tab. 1: Übersicht über Inhibinaktivität in Geweben und Körperflüssigkeiten verschiedener Spezies.

Spezies	Inhibinaktivität in	Autor
Mensch	Plazenta	BANDIVDEKAR et al., 1985
	Follikelflüssigkeit	VAN DIJK et al., 1985
	Follikelflüssigkeit	CHANNING et al., 1984
	Seminalplasma, Serum und Urin	BEKSAC et al., 1984
	Seminalplasma	RAMASHARMA et al., 1984
Rind	Follikelflüssigkeit	MC NEILLY, 1984
	Follikelflüssigkeit	BOLT et al., 1985
	Follikelflüssigkeit	JOHNSON und SMITH, 1985
	Follikelflüssigkeit	MILLER und BOLT, 1985 a, 1985 b
	Follikelflüssigkeit Hoden	HENDERSON et al., 1986
	Seminalplasma	AU et al., 1984 MOHAPATRA et al., 1985
Pferd	Follikelflüssigkeit	CHANNING et al., 1981 b
	Follikelflüssigkeit	MILLER et al., 1981
	Follikelflüssigkeit	BERGFELT und GINTHER, 1985
Schwein	Follikelflüssigkeit	CONDON et al., 1984
	Follikelflüssigkeit	THOMAS und NIKITOVITCH-WINER, 1984
	Follikelflüssigkeit	REDMER et al., 1985
	Seminalplasma	MIYAMOTO et al., 1985 c
Schaf	Follikelflüssigkeit	CUMMINS et al., 1983
	ovarielles Blutplasma, ovarielle Lymphe	FINDLAY et al., 1986
	Rete-Testes-Flüssigkeit	BLANC et al., 1978
Ziege	Seminalplasma	MIYAMOTO et al., 1985 c
Ratte	Follikelflüssigkeit	FUJI et al., 1983
	Follikelflüssigkeit und periph. Blut	LEE et al., 1984 a, b
	Plazenta	BANDIVDEKAR et al., 1985
	ovarielles Venenblut	TAYA et al., 1984
	Granulosazellen	CROZE und FRANCHIMONT, 1984
	Granulosazellen	SANDER et al., 1984
	Hoden	BELLABARA et al., 1984
	Hoden	AU et al., 1985
Kaninchen	Sertolizellen	ULTEE VAN GESSEL, 1986
	Plazenta	BANDIVDEKAR et al., 1985
Maus	Granulosazellen	GOODMAN, 1984
	periph. Blut	LEE und GIBSON., 1985

BEKSAC et al. (1984) wiesen darauf hin, daß Inhibin auch durch die Prostata sezerniert wird, da sie hohe Mengen eines Inhibin-ähnlichen Materials im Samen, Serum und Urin von vasektomierten oder gonadektomierten Männern fanden und somit ein extragonadaler Inhibinbildungsort vorhanden sein muß. Für die Prostata als Inhibin produzierendes Organ sprach die Anhäufung der FSH-hemmenden Aktivität in der Prostata-reichen Fraktion des Seminalplasmas.

Auch PEEK und WATKINS (1979) fanden im Seminalplasma von vasektomierten Bullen eine, durch ein Protein hervorgerufene Gonadotropinhemmung nicht testikulären Ursprungs. Sie machen jedoch darauf aufmerksam, daß sich dieses Protein chemisch von Inhibin unterscheiden könnte. MIYAMOTO et al. (1985 b) konnten keine Inhibinaktivität im Extrakt der akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Ziegenbock nachweisen, fanden sie aber im Hodenextrakt und im Seminalplasma.

Daß das ovarielle Inhibin von den Granulosazellen gebildet wird, demonstrierten ERICKSON und HSUCH (1978). Die Zugabe kohleextrahierten Zellkulturmediums zu kultivierten HVL-Zellen von Ratten bedingte eine Erniedrigung der FSH-Sekretion. In kultiviertem ovarielltem Stroma oder Luteingewebe konnte keine Inhibinaktivität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu produziert Follikelgewebe in vitro Inhibin und das Entfernen der Granulosazellen von der Follikelwand senkt die Inhibinmenge um 80% (HENDERSON und FRANCHIMONT, 1983). Auch CROZE und FRANCHIMONT (1984), GOODMAN (1984), SANDER et al. (1984) und HENDERSON et al. (1985) beschrieben die Bildung eines FSH-hemmenden Faktors durch Granulosazellen in vitro.

FINDLAY et al. (1986) zerstörten makroskopisch sichtbare (0,4 mm) Follikel von Schafen mittels Elektrokauter und maßen danach in der ovariellen Lymphe die Inhibinaktivität. Deren schneller und anhaltender Abfall ließ die Autoren zu dem Schluß kommen, daß die Tertiärfollikel die Quelle des gemessenen Inhibins sind und daß das ovarielle lymphatische System der Weg des Inhibins in die periphere Zirkulation sein könne.

BANDIVDEKAR et al. (1985) suchten in der Plazenta, einem biologisch aktive Peptide produzierenden Organ, nach Inhibin und fanden es bei Mensch, Kaninchen und Ratte.

Über den Wirkungsort des Inhibins werden verschiedene Ansichten vertreten. Während CHAPPEL und BARRACLOUGH (1977), LUMPKIN et al. (1981) und CONDON et al. (1984) eine Beeinflussung der GnRH-Sekretion durch Inhibin sehen, glauben CUMMINGS et al. (1983), DE GREFF et al. (1983) und KOITER et al. (1983) nicht an eine Beteiligung des Hypothalamus, sondern nennen als einziges Zielorgan der Inhibinwirkung die Hypophyse. Auch BAKER et al. (1984) sind der Ansicht, daß das Inhibin die FSH-Sekretion durch Rezeptorbindung an die Membran der gonadotrophen Zellen im Hypophysenvorderlappen reguliert. MC NEILLY (1984) beschrieb, daß bovine Follikelflüssigkeit, i.v. injiziert, bei Schafen zwar eine FSH-Hemmung hervorrief, die pulsatile LH-Freisetzung aber unbeeinflusst blieb. Er unterstützt daher die Hypothese der Hypophyse als einzigem Inhibinwirkungsort, denn jedem LH-Puls geht ein GnRH-Stimulus voraus, so daß der FSH-Abfall spezifisch und an der Hypophyse initiiert sein muß.

Für SHETH et al. (1984) hat das Inhibin drei verschiedene Wirkungsmöglichkeiten, nämlich am Hypothalamus durch Blockade der GnRH-Synthese, an der Hypophyse durch Regulierung der FSH-Freisetzung und an den Gonaden durch Beeinflussung der FSH-Aktivität. Mit dem Nachweis von Inhibitoren in der Follikelflüssigkeit, die die Fähigkeit haben, durch Bindung an die FSH-Rezeptoren der Granulosazellen die FSH-Wirkung zu modifizieren, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß Inhibin auch lokal in den Ovarien wirkt. DE JONG und ROBERTSON (1985) sind der Auffassung, daß diese Inhibinaktivität wahrscheinlich nicht mit der FSH-hemmenden Wirkung gleichzusetzen ist:

2.2.2. Bioassays für Inhibin

Um die Inhibinaktivität in den einzelnen Organen oder Substanzen nachzuweisen, werden unterschiedliche Bioassay-Methoden verwendet. Dabei wird entweder die direkte FSH-Hemmung gemessen oder indirekt, durch einen aus der FSH-Unterdrückung resultierenden Effekt auf Inhibinaktivitäten geschlossen.

Einige Autoren machten auf die Problematik der Spezifität der Inhibinnachweise aufmerksam (DURELL et al., 1983; DE JONG und ROBERTSON, 1985). Die Schwierigkeit besteht darin, daß eine Hemmwirkung als Parameter dient. Jede Substanz, die einen toxischen Effekt hat oder die Zellfunktion negativ beeinflusst, kann ebenfalls eine Abnahme der FSH-Sekretion oder -Synthese bewirken. Deshalb ist es wichtig, die Effekte, die dem Inhibin zugesprochen

werden, von den vielen anderen möglichen toxischen oder unspezifischen Ursachen, die im In vivo- oder In vitro-Versuch zu einer FSH-Suppression führen können, zu trennen (BAKER et al., 1984). DE JONG und ROBERTSON (1985) wiesen darauf hin, daß es obligatorisch sein muß, den Einfluß einer Testsubstanz auf die Vitalität der kultivierten Zellen zu prüfen. Durch die Bestimmung anderer Hormone im Kulturmedium oder Zellextrakt - z.B. LH oder Prolaktin - werden unspezifische Effekte verdeutlicht.

2.2.2.1. In vivo-Methoden

Eine häufig benutzte In vivo-Methode zum Inhibinnachweis ist die der Unterdrückung des postkastralen FSH-Anstieges. Ausgehend von der Erkenntnis, daß nach der Kastration durch die Aufhebung des Feed-back-Mechanismus der Steroidhormone mit dem Hypothalamus und der Hypophyse ein extremer Gonadotropin-Anstieg bedingt ist, verabreichte man kastrierten Tieren vermutlich Inhibin enthaltende Substanzen und beobachtete eine Hemmung der postkastralen FSH-Sekretion (DE JONG und SHARPE, 1976; MILLER et al., 1979 a; BRAUN et al., 1980; MARTIN et al., 1984; MILLER und BOLT, 1985 a, b).

AL-OBAIDI et al. (1984) gelang es bei Schafen, die durch bovine Follikelflüssigkeit induzierte Unterdrückung des kastrationsbedingten FSH-Anstieges aufzuheben, indem sie Serum injizierten, das von Schafen stammte, die gegen teilweise gereinigtes bovines Inhibin immunisiert worden waren.

Ein weiterer indirekter In vivo-Bioassay für Inhibin ist die umgekehrte Steelman-Pohley Methode. STEELMAN und POHLEY (1953) beobachteten, daß die durch human Corionic Gonadotropin (hCG) hervorgerufene Ovar- und Uterusgewichtszunahme durch FSH verstärkt wird. Demzufolge müssen Inhibin-haltige Substanzen durch ihre FSH-hemmende Wirkung den hCG-Effekt auf Ovarien und Uterus verringern (CHARI et al., 1976; DAUME et al., 1978; MIYAMOTO et al., 1985 c; MOHAPATRA et al., 1985).

Nach Verabreichung Inhibin-haltiger Extrakte oder Körperflüssigkeiten an intakte Tiere konnte durch Messung des Blutplasmaspiegels eine direkte FSH-Erniedrigung festgestellt werden (HOFFMANN et al., 1979; RUSH und LIPPNER, 1979; HERMANS et al., 1981; BRAUN et al., 1983 a).

2.2.2.2. In vitro-Methoden

Der Überlegung folgend, daß nur ein gemeinsamer Releasing-Faktor, nämlich das GnRH, für LH und FSH existiert und somit eine selektive FSH-Hemmung nur an einem dem Hypothalamus untergeordneten Organ stattfinden kann, wurden In vitro-Kultivierungen von Hypophysengeweben zum Inhibinnachweis eingesetzt.

Die kurzzeitige Inkubation von Hypophysenhälften oder -teilen mit GnRH und Testmaterial erwies sich - vielleicht durch die nur dreistündige Inkubationsdauer - als relativ unsensible Methode und erbrachte keine übereinstimmenden Resultate. So führten zum

Beispiel Proteine der Rete-testis-Flüssigkeit als Testmaterial teilweise zu einer stärkeren Hemmung der LH-Sekretion, verglichen mit der FSH-Sekretion (HUDSON et al., 1979). JENNER et al. (1982) inkubierten Ratten-Hypophysenhälften für acht Stunden mit boviner Follikelflüssigkeit und erreichten eine deutliche, selektive Hemmung der FSH-Freisetzung.

Monolayer-Kulturen aus dispergierten Zellen des Hypophysenvorderlappens bewährten sich als ein geeignetes System zur Darstellung der Inhibinaktivität. Am häufigsten wurden Zellen der Rattenhypophyse kultiviert (BAKER et al., 1976; EDDIE et al., 1979; PADMANABHAN et al., 1984). Aber auch HVL-Zellkulturen von Schafen (MILLER et al., 1977; GRAY et al., 1984; HUANG und MILLER, 1984), Rindern (BRAUN et al., 1983 c) und Kaninchen (GOODMANN, 1984) konnten kultiviert und zum Inhibinnachweis benutzt werden.

Nach der Gewinnung der Zellen und einer bestimmten Kultivierungsphase wird das Kulturmedium mit den Testsubstanzen versetzt. Im Anschluß an eine festgesetzte Inkubationszeit wird die Reaktion der Zellen entweder an der Sekretionsrate der Gonadotropine - d.h. Hormongehalt im Kulturmedium - (EDDIE et al., 1979) oder an der Syntheserate - d.h. intrazellulärer Hormongehalt - (DE JONG et al., 1979 a; SCOTT et al., 1980) mittels RIA gemessen. Außerdem kann die basale oder GnRH-induzierte Gonadotropin-Freisetzung oder -Synthese überprüft werden (BRAUN et al., 1983 c; CROZE und FRANCHIMONT, 1984).

2.2.3. Physiologische Bedeutung von Inhibin

Außer um den Nachweis von Inhibin in den einzelnen Substraten ist man um eine Erklärung seiner physiologischen Bedeutung bemüht.

Im weiblichen Organismus wird dem Inhibin durch seinen hemmenden Einfluß auf die FSH-Sekretion vor allem eine Rolle im Prozess der Follikelreifung zugesprochen. So wurde bei Stuten beobachtet, daß sich nach Gabe equiner Follikelflüssigkeit das Follikelwachstum und der Zeitpunkt der Ovulation verzögerten. Das Ovulationsintervall war um 6 - 9 Tage verlängert (BERGFELT und GINTHER, 1985). Auch bei Schafen (MILLER et al., 1979 a; WALLACE und MC NEILLY., 1985; HENDERSON et al., 1986), Rindern (MILLER et al., 1979 a; BRAUN et al., 1983 a; JOHNSON und SMITH, 1985; QUIRK und FORTUNE, 1986) und Affen (CHANNING et al.: 1981 a) beeinflusste Follikelflüssigkeit verschiedener Spezies die Zyklusdauer und die Ovarfunktion.

Der Inhibingehalt in der Follikelflüssigkeit steigt mit zunehmendem Follikeldurchmesser, in atretischen Follikeln ist er geringer als in Ovulationsfollikeln. Kurz vor der Ovulation kommt es bei der Stute (CHANNING et al., 1981), der Ratte (FUJI et al., 1983; SANDER et al., 1984) und dem Rind (HENDERSON et al., 1985) nochmals zu einem Anstieg des Inhibingehaltes in der Follikelflüssigkeit. PADMANABHAN et al. (1984) beobachteten in der bovinen Follikelflüssigkeit zum Zeitpunkt des präovulatorischen Gonadotropin-Peaks ein Absinken der Inhibinaktivität, dem ein rascher Anstieg noch vor der Ovulation folgte.

CHANNING et al. (1982) interpretieren die Aufgabe von Inhibin bei der Kontrolle der Oocytenreifung so, daß das Inhibin eine zu hohe FSH-Sekretion verhindert und somit das FSH-LH-Gleichgewicht aufrecht erhält. Außerdem kann durch das Feedback des Inhibins mit dem FSH das Signal für den 2. FSH-Peak am Morgen des Oestrus ausgelöst werden.

HENDERSON et al. (1985) sehen die Möglichkeit, daß durch den Feedback-Effekt von Inhibin auf die FSH-Freisetzung die Zahl der Follikel reguliert wird, die bis zur Ovulation ausreifen. So erklären sich auch DE JONG et al. (1978) die Inhibinwirkung und weisen gleichzeitig darauf hin, daß das testikuläre Inhibin durch die vermutlich vorübergehende FSH-Suppression eine Regulierung der Spermatogenese bedingt und somit dem testikulären und ovariellen Inhibin ähnliche Aufgaben zukommen.

Da die Spermatogenese während der Pubertät durch einen FSH-Anstieg induziert wird und das FSH bei der Transformation der Spermatiden zu Spermatozoen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, kann dem Inhibin des Hodens eine Kontrollwirkung auf die Spermatogenese zugesprochen werden. Belegt wird diese Hypothese dadurch, daß der Zeitpunkt der minimalen Inhibinwirkung - z.B. nach Ligatur der Ductuli efferentes - mit dem Zeitpunkt des maximalen FSH-Serumspiegels übereinstimmt (KRAUSE, 1977; AU et al., 1984).

Beim erwachsenen männlichen Tier könnte die Reduktion der FSH-Sekretion durch Inhibin direkt oder indirekt den Prozess der Sper-

matogenese beeinflussen, so etwa durch Erniedrigung der Androgen-Binding-Protein-Konzentration. Es ist bekannt, daß eine optimale Testosteronkonzentration Voraussetzung für die Spermatozytenreifung (primärer Spermatozyt - sekundärer Spermatozyt) ist. Das Androgen-Binding-Protein könnte für die Aufrechterhaltung dieser Konzentration im Bereich der Tubuli seminiferi wichtig sein (FRANCHIMONT et al., 1978).

2.2.4. Inhibinaktivität in der Follikelflüssigkeit

Die gelbliche und leicht visköse Follikelflüssigkeit wird aus Sekretionsprodukten des Follikels und aus Plasmaexsudaten gebildet. Durch deren Zusammensetzung werden Wechsel im sekretorischen Prozess der Granulosazellen und der Theca interna sowie pathologisch und physiologisch bedingte Veränderungen der Plasmakomponenten reflektiert.

Da der Prozess der Follikelreifung mit dem Größerwerden der Follikelhöhle und damit der Anreicherung von Follikelflüssigkeit einhergeht, liegt die Vermutung nahe, daß Bestandteile der Follikelflüssigkeit die Oozytenreifung beeinflussen und/oder Indikatoren für den Reifungsgrad des individuellen Follikels darstellen. Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Dynamik der Substanzen und Hormone in der Follikelflüssigkeit in Abhängigkeit vom Zyklus (ANDERSEN et al., 1976; STOLLA und HIMMER, 1979, BAMBERG et al., 1980; MC NATTY et al., 1981; DIELEMAN et al., 1983; MEINECKE et al., 1984).

Wie bereits erwähnt, spiegelt sich die Sekretionsleistung des Follikels im Hormongehalt der Follikelflüssigkeit wider. Art und Konzentration der Hormone können als Kriterien für die Beurteilung der Follikelqualität dienen, d.h. zur Differenzierung atretischer Follikel von Ovulationsfollikeln (CARSON et al., 1981; KRUIP et al., 1985; CHA et al., 1986).

Nachdem DE JONG und SHARPE (1976) zum ersten Mal eine Inhibin-ähnliche Aktivität in der Follikelflüssigkeit beschrieben hatten, folgten zahlreiche weitere Veröffentlichungen, die sich mit dem selektiv FSH-hemmenden Faktor in der Follikelflüssigkeit verschiedener Spezies beschäftigten.

2.2.4.1. Die bovine Follikelflüssigkeit (bFF)

DE JONG und SHARPE (1976) überprüften das Vorhandensein eines selektiv FSH-hemmenden Faktors in der bFF durch den Vergleich der Effekte nach Injektion von Blutplasma oder Follikelflüssigkeit auf den LH- und FSH-Blutspiegel bei frisch kastrierten männlichen Ratten. Dabei setzten sie im ersten Experiment dem Blutplasma entweder die gleiche Menge oder eine höher dosierte Menge Östradiol-17 β und Testosteron zu, als sie in der Follikelflüssigkeit gemessen hatten. In einem zweiten Experiment wurden steroidfreie bFF - entweder kohle- oder ätherextrahiert - und zwei Reinigungsfractionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (10 KD bzw. - 10 KD) eingesetzt. Die Gruppen, behandelt mit Blutplasma ohne Steroidzugabe und die unbehandelten Kontrollen unterschieden sich

nicht - der postkastrale Gonadotropinanstieg fand statt. Bei den Gruppen, die Blutplasma mit hohen und niedrigen Steroiddosen erhalten hatten, kam es zu einer signifikanten Hemmung sowohl des FSH- als auch des LH-Anstieges, aber beide Hormonspiegel waren gegenüber den Ausgangswerten erhöht. Unbehandelte, äther-extrahierte oder kohlegereinigte bFF sowie die Reinigungsfraction mit dem höheren MW verhinderten einen FSH-Anstieg über den Ausgangswert und hemmten teilweise den LH-Anstieg. Die niedermolekulare Fraction der bFF beeinflusste den FSH- und LH-Anstieg nach der Kastration nur wenig.

DE JONG et al. (1979 a) beschrieben den Nachweis der Inhibinaktivität von bFF in der Ratten-Hypophysen-Zellkultur, JENNER et al. (1982) benutzten Hypophysenhälften von weiblichen Ratten und BRAUN et al. (1983 c) untersuchten die Inhibinwirkung von bFF und boviner Zystenflüssigkeit im homologen System, also in der Hypophysen-Zellkultur vom Rind.

MIYAMOTO et al. (1985 c) benutzten zum In vitro-Nachweis ganze Maushypophysen, die sie für 1 Stunde mit Testmaterial inkubierten. In vivo maßen sie die Inhibinaktivität an der Unterdrückung der hCG-induzierten Ovargewichtszunahme bei Mäusen. Die deutlichste FSH-hemmende Wirkung fanden sie in einer Ultrafiltratfraction mit einem MW von 10 bis 30 KD.

BFF rief bei intakten Rindern (BRAUN et al., 1983 a) und intakten Schafen (MILLER et al., 1982) eine Senkung des FSH-Blutplasmaspiegels hervor. Beim Schaf wurde gleichzeitig ein der Hemmung

folgender Rebound-Effekt der FSH-Sekretion beschrieben, d.h. das FSH stieg nach der Suppression unverhältnismäßig hoch an.

Um Interferenzen mit den Steroidhormonen auszuschließen, verabreichte man bFF an seit längerem kastrierte Schafe (MILLER und BOLT, 1985 a; 1985 b;), Rinder (IRELAND et al., 1983) und Schweine (BOLT et al., 1985) und erhielt ebenfalls einen Abfall des peripheren FSH-Gehaltes.

Merino-Schafe wurden gegen bFF oder bovines Serumalbumin (bSA) immunisiert und 2 Jahre später ovariectomiert. Acht Monate danach führte die Injektion einer Inhibin-haltigen Fraktion von bFF nur in den bSA-Kontrollgruppen zur FSH-Hemmung. Der Grad der Hemmung konnte durch 20 ml Serum aus dem Blut der gegen bFF immunisierten Schafe reduziert werden. Man schloß daraus, daß das Blut von Schafen, die gegen bFF immunisiert worden waren, Substanzen enthält - wahrscheinlich Antikörper -, die die FSH-hemmende Wirkung der bFF neutralisieren können (AL-OBAIDI et al., 1984).

Es ist vielfach beschrieben, daß es nach Verabreichung von bFF zu Veränderungen im zyklischen Geschehen des weiblichen Tieres kommt. Beim Schaf (MILLER et al., 1979 a; MC NEILLY, 1984) und beim Rind (MILLER et al., 1979 a; BRAUN et al., 1983 a; JOHNSON und SMITH, 1985; QUIRK und FORTUNE, 1986) trat nach der Behandlung mit bFF eine Zyklusverlängerung auf. HENDERSON et al. (1986) beobachteten, daß der Oestrus bei maximaler FSH-Suppression am deutlichsten verzögert einsetzte und dieser Effekt durch PMSG, das eine hohe FSH-Aktivität hat, nicht aufgehoben werden konnte.

Eine erhöhte Ovulationsrate durch bFF wurde beim Schaf festgestellt (WALLACE und MC NEILLY, 1985; CUMMINS et al., 1986; HENDERSON et al., 1986), vergesellschaftet mit einer erhöhten Embryonensterblichkeit, wenn die bFF-Gabe in die Lutealphase des Zyklus fiel (WALLACE und MC NEILLY, 1986). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Ovulationsrate sehen HENDERSON et al. (1986) in dem beobachteten Gonadotropinanstieg nach Beendigung der bFF-Verabreichung, denn es ist bekannt, daß FSH oder Substanzen mit FSH-ähnlicher Aktivität die Zahl der ovulierenden Follikel erhöht.

Die Luteinisierungsvorgänge am Ovar nach der Ovulation werden durch bFF nicht beeinflußt (JOHNSON und SMITH, 1985; QUIRK und FORTUNE, 1986). HENDERSON et al. (1986) behandelten Schafe über einen Zeitraum von 27 Tagen mit bFF. Über die gesamte Versuchsdauer waren die Plasma-FSH- und Plasma-Progesteron-Konzentrationen erniedrigt, die von LH erhöht. Es war kein Oestrus erkennbar, die Ovarien hatten keine sichtbaren Corpora lutea gebildet. Nach Beendigung der bFF-Behandlung normalisierten sich alle Hormonwerte schnell, der Oestrus setzte bei allen Tieren nach einigen Tagen ein. Sie wurden gedeckt und gebaren alle je ein Lamm. In einem zweiten Experiment stellten die Autoren fest, daß die bFF keine Auswirkung auf die Anzahl der Follikel hatte, jedoch waren in den großen Follikeln im Vergleich zu den kleineren signifikant weniger Granulosazellen und ein niedrigerer Oestradiol-17 β -Gehalt in der Follikelflüssigkeit. Als möglicher Faktor für die gemachten Beobachtungen wurde das in der bFF enthaltene Inhibin genannt.

2.2.4.2. Die equine Follikelflüssigkeit (eFF)

In den wenigen veröffentlichten Arbeiten über den Einfluß der eFF auf die Gonadotropinsekretion wurden zur Untersuchung ausnahmslos In vivo-Bioassays benutzt.

MILLER et al. (1979 b) untersuchten den Effekt von intravenös injizierter eFF auf die Gonadotropinkonzentration im peripheren Blut bei seit längerem ovariectomierten Ponystuten. Unbehandelte eFF senkte den FSH-Gehalt dosisabhängig, von den Steroidhormonen gereinigte eFF hatte eine geringere hemmende Wirkung. Die Behandlung mit der steroid-haltigen eFF-Fraktion sowie mit einer Fraktion, in der die Proteine denaturiert worden waren, brachte keine Veränderung. Die LH-Konzentration fiel nach der Verabreichung der unbehandelten eFF zuerst ab und stieg dann weit über den Ausgangswert an. Daß diese Substanz mit Oestradiol-17 β interagiert, folgerte das gleiche Autorenteam (MILLER et al., 1981) nach getrennter und gemeinsamer Injektion von Oestradiol-17 β und kohleabsorbierter eFF.

CHANNING et al. (1981 b) stellten fest, daß die eFF aus atretischen bzw. intakten Follikeln den postkastralen FSH-Anstieg bei weiblichen Ratten unterschiedlich hemmt und schlossen daraus, daß die Flüssigkeit aus atretischen Follikeln weniger Inhibin-Aktivität besitzt, als die aus intakten Follikeln.

Auch bei zyklischen Stuten bewirkte eFF eine Senkung des FSH-Blutspiegels. Eine Verminderung der FSH-freisetzenden GnRH-Wir-

kung wurde beobachtet, wenn vor der Injektion des synthetischen GnRH-Analogons eine eFF-Behandlung erfolgt war (EVANS et al., 1981). Außerdem bewirkte eFF ein verzögertes Follikelwachstum und ein verlängertes Ovulationsintervall. Der anfänglichen FSH-Suppression folgte nach Beendigung der eFF-Zuführung ein Anstieg der peripheren FSH-Konzentration weit über den Ausgangswert hinaus (BERGFELT und GINTHER, 1985).

2.2.4.3. Die porcine Follikelflüssigkeit (pFF)

Die Wirkung von pFF auf die LH- und FSH-Sekretion bei der zyklischen Ratte untersuchten DE PAOLO et al. (1979) und HOFFMANN et al. (1979). Sie stellten übereinstimmend fest, daß im Proöstrus verabreichte pFF zu einer FSH-Hemmung führt, verdeutlicht durch die Blockade des ersten, am Nachmittag des Proöstrus auftretenden FSH-Peaks. Zwischen der intraperitonealen pFF-Gabe und dem Auftreten der FSH-Hemmung lag eine Latenzzeit von 2-5 Stunden, die Wirkung hielt etwa 10-14 Stunden an und beeinflusste weder Ovulation, noch Follikelreifung und Ovarmorphologie.

Dagegen führte pFF beim Affen zu einem Aufschub oder sogar einer Aufhebung des spontanen oder durch exogen zugeführte Östrogene induzierten interöstrischen Gonadotropin-Peaks: eine Ovulation fand nicht statt. Außerdem zeigte der dominante Follikel vermindertes Wachstum und eine verringerte Anzahl Granulosazellen (CHANNING et al., 1981 a).

Der FSH-hemmende Effekt der pFF konnte auch bei der kastrierten und scheinkastrierten Ratte festgestellt werden. (MARDER et al., 1977; LORENZEN et al., 1978; THOMAS et al., 1984).

MARTIN et al. (1984) konnten den postkastralen FSH-Anstieg bei Läufer Schweinen mit pFF unterdrücken und BOLT et al. (1985) zeigten, daß pFF bei seit längerem kastrierten Schweinen und Schafen die FSH-Konzentration im Blut auf 63 % bzw. 81 % der Ausgangswerte senken kann. Dabei trat die maximale Suppression beim Schaf 6 Stunden und beim Schwein 12 Stunden nach der Injektion auf.

PFF bewirkte bei unilateral kastrierten weiblichen Läufer Schweinen eine Hemmung des erwarteten FSH-Anstiegs. Das verbliebene Ovar zeigte bei den pFF-behandelten Tieren 8 Tage p. op. eine geringere Hypertrophie als das der Kontrolltiere (REDMER et al., 1985).

Bei In vitro-Versuchen mit Ratten-HVL-Zellkulturen führte pFF zu einer dosisabhängigen Hemmung der basalen und GnRH-stimulierten FSH-Sekretion. Größere Mengen pFF senkten auch die LH-Sekretion und höhere GnRH-Konzentrationen überwand den Hemmeffekt von pFF (EDDIE et al., 1979; SHANDER et al., 1980).

Die Zugabe eines durch Acetonfällung und Lyophilisierung erhaltenen Präzipitates aus pFF zur ovinen HVL-Zellkultur senkte die basale FSH-Sekretion. Die basale LH-Freisetzung war nicht beeinflusst. Dagegen stieg die Fähigkeit von GnRH, LH in der Zellkultur freizusetzen um das zwei- bis dreifache an. Daraus wurde ge-

schlossen, daß pFF neben dem "klassischen Inhibineffekt" einen die GnRH-Wirkung steigernden Faktor enthält (HUANG und MILLER, 1984).

2.2.4.4. Die ovine Follikelflüssigkeit (oFF)

Obwohl das Schaf häufig bei In vivo-Versuchen zum Inhibin-Nachweis eingesetzt wird, liegen, im Gegensatz zu bFF, wenig Untersuchungen über die Inhibinaktivität in der oFF vor.

CUMMINS et al. (1983) verglichen den ovariellen Inhibin-Gehalt der sehr fruchtbaren Booroola-Merinos mit dem einer weniger fruchtbaren Merino-Rasse und stellten fest, daß die oFF der Booroola-Schafe nur ein Drittel der Inhibin-Aktivität der Kontrolltiere aufwies. Auf die Behandlung mit oFF reagierten beide Gruppen ovariektomierter Tiere mit einem Abfall des FSH-Plasmaspiegels, die Booroola-Merinos einen Tag früher. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß die Feedback-Beziehung von Inhibin und FSH bei den Booroolas sich von der der Kontrollschafe unterscheidet und dies zu den verschiedenen Ovulationsraten bei den Schafen dieser beiden Genotypen führen könnte.

EDDIE et al. (1982) beschrieben die FSH-hemmende Wirkung von oFF in der HVL-Zellkultur von Ratten. Auf den von den Autoren festgestellten biphasischen Sekretionsrhythmus der Gonadotropine durch die Zellen in vitro hatte oFF keinen Einfluß.

TSONIS et al. (1983) und FINDLAY et al. (1986) nutzten die Ratten-HVL-Zellkultur u.a., um die Beziehung zwischen Funktionsstadium und Inhibingehalt der ovinen Follikel zu klären und berichteten, daß der große Ovulationsfollikel der Hauptträger der Inhibinaktivität ist. Weiterhin erstellten FINDLAY et al. (1986) nach Untersuchungen des peripheren Blutes und der ovariellen Lymphe die Hypothese, daß das ovarielle lymphatische System der Weg sein müsse, auf dem das Inhibin die Peripherie erreicht.

2.2.4.5. Die humane Follikelflüssigkeit (hFF)

Bei Frauen, deren Ovarien durch Anti-Krebs-Drogen beschädigt waren, konnte eine veränderte FSH-Sekretion beobachtet werden. Dies ließ vermuten, daß auch bei Frauen - analog zum Mann - ein FSH-Inhibitor vorhanden ist, der in Abhängigkeit vom Funktionsstatus im Ovar gebildet wird (THOMAS et al., 1977).

Der Nachweis der Inhibinaktivität in der hFF gelang in Versuchen in vivo und in vitro (DAUME et al., 1978; CHARI et al., 1979). Ausführliche Arbeiten beschäftigten sich mit der Korrelation von Inhibin- und Steroidgehalt in der hFF (CHANNING et al., 1981 c; LEFEVRE et al., 1981) und dem Inhibingehalt in Abhängigkeit vom Zyklusstadium (CHAPPEL et al., 1980).

Daß schon bei Säuglingen im Alter von 18 - 200 Tagen eine signifikante Inhibinwirkung in der Follikelflüssigkeit besteht, konnten CHANNING et al. (1984) nachweisen.

Ausgelöst durch die Beobachtung, daß bei polyzystischem Ovarsyndrom (PCO) ein normaler oder erniedrigter FSH-Spiegel mit einem Anstieg des peripheren LH-Gehaltes vergesellschaftet ist, untersuchten TANABE et al. (1983) die Follikelflüssigkeit von gesunden Frauen und von Frauen mit PCO auf ihre Inhibinaktivität und kamen zu der Vermutung, daß das Inhibin bei dem oben erwähnten Syndrom beteiligt sein müsse.

2.2.5. Seminalplasma

Als Seminalplasma bezeichnet man die die Spermien beinhaltende Flüssigkeit während der Ejakulation. Es ist ein Gemisch aus den Sekreten der verschiedenen akzessorischen Geschlechtsdrüsen des männlichen Genitaltraktes und dient als natürlicher Träger verschiedener Stoffe zur Energieversorgung und als Transportmittel für die Spermien.

Obwohl die Inhibin-Forschung sich in den siebziger Jahren hauptsächlich mit dem FSH-hemmenden Faktor bei männlichen Spezies beschäftigte, gewannen die Arbeiten über das feminine Inhibin in den letzten Jahren die größere Bedeutung. Die hier aufgeführten Literaturangaben sind allerdings nur ein kleiner Teil der erschienen Veröffentlichungen über maskulines Inhibin, da außer dem Seminalplasma noch andere Extrakte und Exsudate des Genitaltraktes untersucht wurden (Tab. 1).

Der Nachweis einer FSH-hemmenden Aktivität im Bullenseminalplasma (bSP) durch Einsatz von Rohextrakten - meist durch Acetonfällung gewonnen -, oder gereinigte Fraktionen im In vivo-Bioassay mit Ratten ist häufig beschrieben (FRANCHIMONT et al., 1977; CHARI et al., 1978; MIYAMOTO et al., 1985 c; MOHAPATRA et al., 1985). BRAUN et al. (1980) erzielten bei ovariectomierten Kühen mit einem Rohextrakt aus bSP dosisabhängig unterschiedliche Ergebnisse. Nur die niedrigste bSP-Menge von 0.125 mg bewirkte eine selektive FSH-Hemmung.

PEEK und WATKINS (1979) beschrieben, daß das Seminalplasma sowohl von intakten als auch von vasectomierten Bullen in der Lage war, den postkastralen Gonadotropinanstieg - also FSH und LH - bei frisch kastrierten Ratten zu unterdrücken. Obwohl die hemmende Substanz ein Protein war, stellten die Autoren ihre chemische Identität mit dem Inhibin in Frage. Auch SCOTT und BURGER (1981) und BEKSAC et al. (1984) konnten nach Vasektomie keinen Verlust der Inhibinwirkung im humanen Seminalplasma (hSP) feststellen.

Bei Untersuchungen des Effektes von Fraktionen aus hSP nomospermer und azospermer Patienten auf die LH-Sekretion oviner kultivierter HVL-Zellen stellte sich eine LH-Suppression bei Nomospermie dar. Die Aktivität war in den Fraktionen mit MW 10 KD bis 80 KD anwesend, jedoch nicht bei Azoospermie. FSH wurde nicht bestimmt (GRAY et al., 1984).

MIYAMOTO et al. (1985 b) verglichen die Inhibinaktivität von Bullen-, Ziegen- und Eberseminalplasma sowie von bFF im In vivo- und

In vitro-Versuch und erhielten fast übereinstimmende Ergebnisse. Lediglich das porcine Seminalplasma (pSP) zeigte unterschiedliche Effekte in den beiden Versuchsmethoden, was die Autoren auf das große Ejakulatvolumen des Ebers zurückführen. Die aktiven Ultrafiltrat-Fractionen der untersuchten Materialien hatten alle ein Molekulargewicht zwischen 10 KD und 30 KD.

Mit der gleichen In vitro-Methode wie MIYAMOTO et al. (1985 b), der Inkubation der Testmaterialien mit ganzen Maushypophysen, prüften RAMASHARMA et al. (1984) ein aus hSP isoliertes Peptid und dessen synthetisches Replikat auf seine Inhibinwirkung und fanden einen FSH-hemmenden Effekt.

2.2.6. Steroidhormone und Inhibinaktivität

Da alle Bioassays für Inhibin sich die Gesetzmäßigkeit des endokrinen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreises zu Nutze machen, ist es wichtig, daß bei der Beurteilung der Inhibinaktivität die Substanzen mitbedacht werden, die den Assay beeinflussen könnten. Wenn also in einem Versuch keine durch Reinigung erhaltene Inhibinfraktion, sondern die vollständige Körperflüssigkeit eingesetzt wird, müssen bei der Interpretation der Ergebnisse die Sexualsteroiden bedacht werden. Um deren Wirkung ausschließen zu können, unterzieht die Mehrzahl der Untersucher ihre Testsubstanzen einer Reinigung.

Außer durch die am häufigsten angewandte Methode der Kohleadsorption (WELSCHEN et al., 1977) können die Steroidhormone auch durch Ethanolextraktion oder Ammoniumsulfat-Präzipitation entfernt werden (BAKER et al., 1978).

Durch die Kohleadsorption mit hohen Kohlekonzentrationen hatte man ein Absinken der Inhibinaktivität festgestellt. Die Zugabe von Dextran konnte hier eine Besserung bringen (BAKER et al., 1978). Die in der Literatur angegebenen Kohlekonzentrationen reichen von 50 mg/ml (WELSCHEN et al., 1977; REDMER et al., 1985) über 25 mg/ml (IRELAND et al., 1983) und 1 mg/ml (ROBERTSON et al., 1986 b) bis 0,1 mg/ml (CROZE und FRANCHIMONT, 1984). Sie zeigten alle einen gleich guten Reinigungseffekt - die behandelten Substanzen enthielten keine oder so geringe Steroidmengen, daß sie als steroidfrei bezeichnet werden konnten.

Die Untersuchungen des Effektes der Sexualsteroiden auf die Gonadotropinsekretion bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit vermutlich Inhibin-haltigen Substanzen wurden nicht einheitlich kommentiert. BRAUN et al. (1983 b) beobachteten in der bovinen HVL-Zellkultur nach Progesteronzusatz eine Hemmung der basalen und GnRH-induzierten LH- und FSH-Freisetzung, nach Östradiol-17 β -Zusatz einen stimulierenden Effekt auf die GnRH-induzierte und keinen Effekt auf die basale LH- und FSH-Sekretion.

EDDIE et al. (1982) fanden, daß in der Ratten-HVL-Zellkultur Testosteron das LH stärker hemmt als das FSH, während LABRIE et al. (1978) eine Stimulation der FSH- und eine Hemmung der LH-Sekre-

tion durch Testosteron beschrieben. Sie beobachteten außerdem einen stimulierenden Effekt von Östradiol-17 β auf die basale und GnRH-induzierte Gonadotropinsekretion.

Im Gegensatz dazu steht die Veröffentlichung von MILLER et al. (1977), die in der ovinen HVL-Zellkultur nach Zugabe von physiologisch kleinen Mengen Östradiol-17 β (10^{-9} M) eine extreme FSH-Hemmung feststellten. Andere Steroide hatten keine Wirkung.

Die vergleichende Verwendung von steroidfreier und unbehandelter Follikelflüssigkeit zeigte, daß die dem Inhibin zugesprochene FSH-hemmende Wirkung auch ohne Anwesenheit von Steroidhormonen vorhanden ist (FUJI et al., 1983; MC NEILLY, 1984; PADMANABHAN et al., 1984; BERGFELT und GINTHER, 1985; MILLER und BOLT, 1985 b).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden sowohl im bovinen als auch im ovinen HVL-Zellkultursystem durchgeführt, da sich in der zuerst gewählten Zellkultur vom Rind der dosisabhängige selektiv FSH-hemmende Effekt durch Follikelflüssigkeit und Seminalplasma nicht eindeutig nachweisen ließ (s. Kap. 3.4.3.). Material und Methode der bovinen HVL-Zellkultur werden deshalb im Folgenden nur im Prinzip dargestellt.

3.1. Die bovine HVL-Zellkultur

Material und Methodik der bovinen HVL-Zellkultur entsprachen dem von BRAUN et al. (1983 c) beschriebenen Verfahren.

3.1.1. Material

3.1.1.1. Hypophysen

Die verwendeten Hypophysen stammten von Bullen, die am Schlachthof München regulär zur Schlachtung kamen. Nach der Tötung und Eviszeration der Tiere wurden die Schädel geöffnet, die Hypophysen unter möglichst sterilen Bedingungen herausgelöst, in eiskühles BSS-5-fach verbracht und sofort in das Labor transportiert.

3.1.1.2. Follikelflüssigkeit

Die in den Versuchen eingesetzte Follikelflüssigkeit stammte von Rind, Pferd, Schwein, Schaf und Mensch. Sie wurde von Rind, Schwein und Schaf aus den Follikeln von Schlachttieren des Schlachthofes München gewonnen. Direkt nach dem Herausnehmen der Organe durch den Metzger wurden geeignet erscheinende Ovarpaare vom Uterus abgesetzt und auf Eis gelagert.

Entweder noch am Schlachthof oder sofort nach Rückkehr in die Klinik, d.h. maximal nach 2 Stunden, wurde mit steriler Kanüle und Spritze die Flüssigkeit geeigneter Follikel aspiriert. Für die Selektion waren folgende adspektorische Kriterien entscheidend:

- a) eines der beiden Ovarien trug ein deutliches Corpus luteum periodicum,
- b) die Ovarien zeigten keine pathologischen Veränderungen wie z.B. Zysten oder kleinzystische Degeneration,
- c) die Follikelflüssigkeit war nicht mit Blut versetzt,
- d) der Follikeldurchmesser betrug beim Rind 5-20 mm, bei Schaf und Schwein 5-10 mm.

Durch Beachtung dieser Punkte sollte gewährleistet werden, daß nur Follikel aus einem der Norm entsprechenden Zyklus Verwendung fanden.

Die equine Follikelflüssigkeit konnte aus den Ovarien von 2 zur Ovariektomie in die Klinik überwiesenen Stuten gewonnen werden.

Die in den Zellkulturen verwendete eFF wurde aus mehreren kleineren und einem präovulatorischen Follikel aspiriert.

Die humane Follikelflüssigkeit stammte von Patientinnen der Frauenklinik Ulm und wurde im Rahmen der zur In vitro-Fertilisation durchgeführten Untersuchungen gewonnen. Genaue Angaben über Zyklusstadium, Follikelgröße etc. lagen nicht vor.

Nach der Gewinnung wurde die aspirierte Follikelflüssigkeit bis zur Extraktion der Steroidhormone bei -20°C tiefgefroren.

3.1.1.3. Seminalplasma

Nach der Spermagewinnung mittels künstlicher Scheide bei Bulle, Hengst, Eber und Schafbock sowie durch Masturbation beim Mann wurde das Seminalplasma durch Abzentrifugieren der Spermien gewonnen und bis zur Kohleextraktion bei -20°C tiefgefroren.

3.1.2. Methode

3.1.2.1. Extraktion der Steroidhormone

Zur Entfernung der Steroide aus Follikelflüssigkeit und Seminalplasma wurde die von TSONIS et al. (1983) beschriebene Methode der Kohleadsorption eingesetzt:

- a) Zentrifugieren der Flüssigkeiten für 2 min bei 7000 g, um Gewebsdebris zu entfernen.
- b) Mischen des Überstandes mit 1,0 mg/ml Kohle und 0,01 % Dextran.
Rühren für 10 min. bei Raumtemperatur.
- c) 30 min bei +4°C aufbewahren,
- d) Zentrifugieren für 20 min bei 7000 g.

Der Überstand wurde in Portionen von 1 ml aufgeteilt und bei -20°C tiefgefroren gelagert.

3.1.2.2. Zellkultur

Alle Arbeitsgänge im Zellabor wurden unter sterilen Bedingungen in einer Flow-Bank durchgeführt.

3.1.2.2.1. Gewinnung der Zellen

Durch einen Längsschnitt wurden die Hypophysen so geteilt, daß der Vorderlappen isoliert und in kleine Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten werden konnte.

Zum Lösen der bindegewebigen Substanzen wurden die HVL-Stückchen in 50 ml Collagenaselösung gegeben und in einem Erlenmeyerkolben für 45 min bei +37°C im Wasserbad langsam gerührt.

Der durch Zentrifugieren erhaltene Überstand wurde verworfen, das sedimentierte Gewebe in 33 ml Pankreatinlösung aufgeschwemmt und für 20 min bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad gerührt.

Nun folgte - nach Sedimentation der groben Gewebestücke - das Abhebern des Überstandes, der anschließend mit 10 % Pferdeserum versetzt und in einem Eiswasserbad im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Diese Schritte der Pankreatindispersierung des Sedimentes wiederholten sich noch zweimal. Die gesammelten Überstände wurden für 15 min bei 800 g und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Der so erhaltene Bodensatz wurde durch dreimaliges Aufschwemmen mit BSS-1-fach und anschließendes Zentrifugieren für 15 min bei 800 g und $+4^{\circ}\text{C}$ gewaschen.

Nach dem dritten Waschvorgang wurden die dispergierten Zellen in 30 ml MEM-Alpha-Medium + Pferdeserum gegeben und durch ein dünnmaschiges Netz filtriert, um so die fertige, von den undispergierten Gewebestücken getrennte Zellsuspension zu erhalten.

3.1.2.2.2. Vitalfärbung und Zelldichte

Die Vitalität der dispergierten Zellen wurde durch eine Trypanblau-Färbung überprüft. Dazu gab man zu 1 ml der 30 ml Zellsus-

pension 0,5 ml Trypanblau-Lösung (MAYR et al., 1974). Bei den toten oder geschädigten Zellen kann der blaue Farbstoff durch die veränderte Membranpermeabilität in das Zellinnere eindringen und bewirkt so eine Blaufärbung der Zellen. Intakte Zellen bleiben ungefärbt und zeigen im Lichtmikroskop einem deutlichen Rand, der das einfallende Licht beim Fokussieren leicht reflektiert.

Mit der gefärbten Zelllösung wurde eine Zählkammer nach Türk beschickt. Durch Auszählen und Subtraktion der toten von den gesamten Zellen ergab sich die Zahl der lebenden Zellen. Der Prozentsatz der lebenden Zellen von der Gesamtzellzahl bildet die Vitalitätsrate.

Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählen der lebenden Zellen in der Türk'schen Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die durchschnittliche, in den 4 Kammern à 16 Felder ermittelte Zellzahl (Z) in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Anzahl Zellen (AZ)/ml} = \frac{Z \times 25 \times 10 \times 1,5 \times 1000}{64}$$

Die Formel ergibt sich aus der Kammerhöhe (0,1 mm), der Zahl der Felder (64), der Fläche eines Feldes ($1/25 \text{ mm}^2$), dem Verdünnungsfaktor (1,5) und der Zellzahl Z.

Mit der Kenntnis der Anzahl Zellen pro Milliliter konnte nun die Gesamtzellzahl (GZ) für die verbliebenen 29 ml Zellsuspension errechnet werden.

3.1.2.2.3. Aussaat in Gewebekulturschalen

Zur Aussaat kamen nur Zellsuspensionen mit einer Vitalitätsrate von mehr als 90 %. Die 29 ml Zellsuspension wurden so mit MEM Alpha-Medium + Pferdeserum verdünnt, daß 1 ml ca. 300000 lebende Zellen enthielt.

Als Kulturgefäße fanden Mehrfachkulturschalen mit 24 Vertiefungen Verwendung, sogenannte multi-well plates. In jede Vertiefung, deren Grundfläche 2 cm₂ und deren Durchmesser 16 mm maßen, wurden 1 ml Zellsuspension pipettiert, aus der sich eine Kultur entwickelte, die im Folgenden als Einzelkultur bezeichnet wird. Die anschließende Bebrütung erfolgte bei +37°C und einem Luft-CO₂-Gemisch von 95 : 5 %.

3.1.2.2.4. Vorinkubation und Kulturwachstum

Während der 48 h Vorinkubationszeit wurde durch wiederholtes Mikroskopieren geprüft, ob die Zellen Wachstum zeigten. Als Parameter dafür dienten die Anhaftung der Zellen am Boden der Kulturschalen, das Auftreten spindelförmiger Zellformen mit fadenförmigen Fortsätzen ab etwa 16 h nach Aussaat sowie die Farbe des Mediums als Hinweis auf eine Änderung des pH-Wertes.

Die Vorinkubationszeit von 48 Stunden wurde gewählt, weil vorausgegangene Versuche gezeigt hatten, daß die Zellen dann ihre volle Sekretionsfähigkeit erreicht haben (BRAUN, 1984).

3.1.2.2.5. Inkubation

Im Anschluß an die Vorinkubation erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen. Die Testsubstanzen wurden so in serumfreiem MEM Alpha-Medium gelöst, daß in 0,1 ml Medium die laut Versuchsplan einzusetzende Menge Substrat enthalten war (Tab. 2). Je 12 Einzelkulturen wurde 0,1 ml der gleichen Dosierung zugesetzt und bildeten somit eine Gruppe. Jeweils 4 - 6 Gruppen wurden gleich behandelt, um die anschließende Stimulation mit unterschiedlichen GnRH-Dosen zu ermöglichen (Tab. 2).

Als Inkubationszeit wurden 24 h gewählt, da sich diese Zeitspanne in Vorversuchen als günstig erwiesen hatte.

3.1.2.2.6. Stimulation

Vor der Gonadotropinstimulation, d.h. 72 h nach der Aussaat, wurde das Medium in den Kulturschalen abgesogen und der Zellrasen 3 mal mit serumfreiem MEM Alpha-Medium durch Zupipettieren und Absaugen gewaschen, um die bis dahin freigesetzten Hormone zu entfernen.

Die Stimulation erfolgte mit dem synthetischen GnRH-Analogen Buserelin. Es wurde in einer logarithmischen Reihe mit 3 - 5 Verdünnungsstufen so in serumfreiem Medium gelöst, daß 1 ml Medium

Tab.2: Versuchsplan zur Behandlung einer bovinen HVL-Zellkultur am Beispiel der bovinen Follikelflüssigkeit (bFF; n = 12 Einzelkulturen je Gruppe).

Gruppe	Vorinkubation ⁺ (48 h) mit	Inkubation ⁺ (24 h) mit	Stimulation ⁺ (6 h) mit
1	Medium	Medium	Medium ohne GnRH
2	"	"	GnRH $10^{-11}M$
3	"	"	GnRH $10^{-10}M$
4	"	"	GnRH $10^{-9}M$
5	"	"	GnRH $10^{-8}M$
6	"	bFF 0,001 µl	Medium ohne GnRH
7	"	"	GnRH $10^{-11}M$
8	"	"	GnRH $10^{-10}M$
9	"	"	GnRH $10^{-9}M$
10	"	"	GnRH $10^{-8}M$
11	"	bFF 0,01 µl	Medium ohne GnRH
12	"	"	GnRH $10^{-11}M$
13	"	"	GnRH $10^{-10}M$
14	"	"	GnRH $10^{-9}M$
15	"	"	GnRH $10^{-8}M$
16	"	bFF 0,1 µl	Medium ohne GnRH
17	"	"	GnRH $10^{-11}M$
usw.	usw.	usw.	usw.

⁺ Alle Inkubationen bzw. Stimulationen wurden in jeweils 1 ml Medium bzw. Medium + GnRH durchgeführt. Die unterschiedlichen Volumina der Follikelflüssigkeit wurden mit Medium auf ein Endvolumen von 0,1 ml verdünnt und zugegeben.

die gewünschte GnRH-Endkonzentration enthielt. Jede Einzelkultur einer Dosierungsgruppe - mit Ausnahme der Kontrollen - erhielt davon 1 ml.

Danach erfolgte das Zupipettieren der 0,1 ml Medium mit der Testsubstanz nach dem gleichen Schema, wie es zur Inkubation Verwendung gefunden hatte (Tab. 2). Die Kontrollen erhielten nach gleicher Vorbehandlung wie die Versuchsgruppen 1 ml Medium ohne GnRH und anschließend 0,1 ml Medium ohne Testsubstanz

Nach 6-stündiger Stimulationszeit wurde das Medium jeder Kultur durch Abpipettieren gewonnen und bis zur Hormonbestimmung über einen Zeitraum von längstens 3 Monaten bei -20°C tiefgefroren gelagert.

3.1.2.3. Hormonbestimmungen

Die Gonadotropine FSH und LH wurden im Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Die FSH-Bestimmung erfolgte nach der Methode von BOLT und ROLLINS (1983), die LH-Bestimmung nach der Methode von SCHAMS und KARG (1969).

Östradiol-17 β wurde mit dem Jod¹²⁵-Östradiol-RIA-Kit der Firma Serono bestimmt. Zur Messung des Progesterongehaltes fand die Methode nach HOFFMANN (1972) Verwendung. Testosteron wurde mit dem Verfahren nach KARG et al. (1977) bestimmt.

3.2. Die ovine HVL-Zellkultur

Die Kultivierung der ovinen HVL-Zellen erfolgte nach der Methode von MILLER et al. (1977).

3.2.1. Material

3.2.1.1. Medien und Lösungen

Vor der Gewinnung der Hypophysen mußten folgende Lösungen angesetzt werden. Die Einstellung des pH-Wertes wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit 1 N HCL bzw. 1 N NAOH vorgenommen. Die genaue Bezeichnung aller verwendeter Reagenzien und die Bezugsquellen sind im Anhang aufgelistet.

1 M Hepeslösung

119 g Hepes

ad 500 ml Aqua bidest.

Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit 6 N NaOH

CaCl₂-Lösung

166,5 g CaCl₂

ad 100 ml Aqua bidest.

Penicillin-Fungizone-Lösung

10⁶ I.E. Penicillin
5 mg Fungizone
ad 100 ml Aqua bidest.

Insulinlösung

100 mg Insulin
33,0 µl Eisessig
438 mg NaCl
ad 50 ml Aqua bidest.

Daraus wurden folgende Arbeitslösungen hergestellt:

Calcium and Magnesium free Hank's balanced salt solution
(CMF-HBSS)

500 ml CMF-HBSS
+ 12,5 ml 1 M Hepeslösung
pH 7,2 - 7,4

HBSS + Calcium

500 ml CMF-HBSS
+ 0,5 ml CaCl₂-Lösung
pH 7.2 - 7,4

Medium 199

10 g Medium 199 Trockensubstanz
2,2 g NaHCO_3
25 ml Hepeslösung
1,2 ml Gentamycin Solution
ad 1000 ml Aqua bidest.
+ 10 ml Penicillin/Fungizone-Lösung
5 ml Insulinlösung
100 ml Kälberserum
pH 7,2 - 7,4

Collagenaselösung

60 mg Collagenase
3 g bovines Serumalbumin (BSA)
ad 100 ml CMF-HBSS

Pankreatinlösung 10%

1 Fl. Pankreatin (0,5 g, lyophilisiert)
ad 5 ml Aqua bidest.

Alle Arbeitslösungen wurden durch Einmalmembranfilter sterilfiltriert.

3.2.1.2. Hypophysen

Die verwendeten Hypophysen stammten von ca. 1 Jahr alten, meist männlichen Schafen, die am Schlachthof München regulär zur

Schlachtung kamen. Direkt nach der Tötung wurden die Köpfe der Tiere abgetrennt und in die Klinik gebracht. Hier wurde mit einer Säge die Schädelplatte geöffnet. Unter möglichst sterilen Bedingungen erfolgte dann die Herausnahme des Gehirns. Mittels sterilem Skalpell und Pinzette wurde die Hypophyse freipräpariert, abgelöst und sofort in +20°C warme CMF-HBSS verbracht.

3.2.1.3. Follikelflüssigkeit (s.Kapitel 3.1.1.2.)

3.2.1.4. Seminalplasma (s.Kapitel 3.1.2.3.)

3.2.2. Methode

3.2.2.1. Extraktion der Steroidhormone

Die eingesetzten Follikelflüssigkeiten und Seminalplasmen wurden nach der in Kapitel 3.1.2.1. beschriebenen Methode von Steroidhormonen gereinigt.

3.2.2.2. Zellkultur

Alle Arbeitsgänge im Labor wurden unter sterilen Bedingungen in einer Flowbank durchgeführt.

3.2.2.2.1. Mechanische Zerkleinerung der Hypophysen

Nach der Entnahme der Hypophysen aus den Köpfen wurde zuerst das den Hypophysen anhängende Binde- und Fettgewebe mit einer Schere grob entfernt. Dann erfolgte durch einen Längsschnitt die Teilung in zwei Hälften. Die einzelnen Abschnitte der Hypophyse waren nun gut zu erkennen und der Hypophysenvorderlappen (HVL) konnte mit Fingerdruck leicht isoliert werden. Mit einer Rasierklinge wurden die HVL-Hälften in ca. 1 mm Kantenlänge messende Würfel geschnitten, in CMF-HBBS gegeben und dreimal durch Abkippen und Wiederauffüllen des Puffers gewaschen.

3.2.2.2.2. Enzymatische Dispergierung

Zum Lösen der bindegewebigen Substanzen wurden zu den HVL-Stückchen pro Hypophyse 33 ml Collagenaselösung gegeben und in einem Erlenmayerkolben für 90 min im +36°C warmen Wasserbad langsam gerührt.

Danach folgte ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g und das Abkippen des Überstandes.

Die Gewebestücke wurden nun in 3 ml Pankreatinlösung/Hypophyse plus 25 ml CMF-HBSS wieder im Wasserbad bei +36°C für 20 min gerührt. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g und Abkippen des Überstandes wurden die dispergierten Zellen gewonnen. Nun wurden die Zellen in 30 ml Medium 199 aufgeschüttelt und wie oben

angegeben zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wiederholte sich dreimal.

Nach dem dritten Waschen wurden die Zellen wieder mit 30 ml Medium 199 aufgeschwemmt und durch ein dünnmaschiges Filternetz filtriert, um die groben und nicht dispergierten Gewebeteile von den einzelnen Zellen zu trennen. Das Filternetz wurde folgendermaßen hergestellt: eine 20 ml-Einmalspritze am vorderen Ende abschneiden; Maschendraht mit einer Maschengröße von 0,02 mm in ca. 3 x 3 cm große Quadrate schneiden; diese über der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzen; den glühenden Draht flach auf das abgeschnittenen Ende der Einmalspritze drücken.

3.2.2.2.3. Vitalfärbung und Zelldichte

Die Vitalfärbung und die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach der in Kapitel 3.1.2.2.2. beschriebenen Methode.

3.2.2.2.4. Aussaat in Gewebekulturschalen

Zur Aussaat kamen nur Zellsuspensionen mit einer Vitalitätsrate von mehr als 80 %. Die 29 ml Zellösung wurden so mit Medium verdünnt, daß 1 ml ca. 220000 lebende Zellen enthielt.

Als Kulturgefäße dienten wieder multi-well-plates (s. Kapitel 3.1.2.2.3.).

3.2.2.2.5. Vorinkubation und Kulturwachstum

Die Wahl der Vorinkubationszeit und die Beurteilung des Wachstums der ovinen HVL-Zellen erfolgte nach den gleichen Kriterien, wie sie für die bovine Zellkultur beschrieben wurden (s. Kapitel 3.1.2.2.4.).

3.2.2.2.6. Inkubation und Stimulation

Nach 48-stündiger Bebrütung erfolgte ein 3-maliges Waschen des Zellrasens durch Absaugen und Zupipettieren von Medium.

Die Verdünnung der Testsubstanzen mit Medium wurde so durchgeführt, daß die Follikelflüssigkeiten in den Enddosierungen 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 und 10.0 $\mu\text{l/ml}$ Medium und die Seminalplasmen in den Enddosierungen 0.01, 0.1, 1.0 und 10.0 $\mu\text{l/ml}$ Medium vorlagen.

Je sechs Einzelkulturen bildeten eine Gruppe und wurden nach Versuchsplan gleich behandelt (Tab.3)

Zur Kontrolle der GnRH-Stimulierbarkeit der kultivierten Zellen bekamen 4 Gruppen 1 ml Medium 199 zupipettiert, in dem Buserelin in den Dosierungen 10^{-11}M bis 10^{-8}M enthalten war.

Als Kontrollen dienten, je nach der zur Verfügung stehenden Gesamtzellzahl, 2 - 4 unbehandelte Gruppen.

Tab.3 :Versuchsplan zur Behandlung einer ovinen HVL-Zellkultur am Beispiel der bovinen (bFF) und equinen (eFF) Follikelflüssigkeit (n = 6 Einzelkulturen je Gruppe).

Gruppe	Vorinkubation ⁺ (48 h) mit	Inkubation ⁺ (24 h) mit	Stimulation ⁺ (6 h) mit
1	Medium	Medium	Medium ohne GnRH
2	"	"	GnRH $10^{-11}M$
3	"	"	GnRH $10^{-10}M$
4	"	"	GnRH $10^{-9}M$
5	"	"	GnRH $10^{-8}M$
6	"	bFF 0,001 μl	Medium ohne GnRH
7	"	bFF 0,01 μl	" " "
8	"	bFF 0,1 μl	" " "
9	"	bFF 1,0 μl	" " "
10	"	bFF 10,0 μl	" " "
11	"	eFF 0,001 μl	Medium ohne GnRH
12	"	eFF 0,01 μl	" " "
13	"	eFF 0,1 μl	" " "
14	"	eFF 1,0 μl	" " "
15	"	eFF 10,0 μl	" " "

⁺ Alle Inkubationen bzw. Stimulationen wurden in jeweils 1 ml Medium bzw. Medium + GnRH durchgeführt. Die unterschiedlichen Volumina der Follikelflüssigkeiten wurden im Inkubationsmedium verdünnt zugegeben.

Nach 24-stündiger Inkubationsdauer wurde das Medium jeder Einzelkultur durch Absaugen gewonnen. Je 200 µl von jeder Einzelkultur einer Gruppe wurden zu einer gepoolten Probe gesammelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Der Zeitraum bis zur Durchführung der Hormonanalysen betrug längstens drei Monate.

3.2.2.3. Hormonbestimmungen

Die Bestimmung des Gonadotropingehaltes im Kulturmedium erfolgte nach den in Kapitel 3.1.2.3. angegebenen Methoden.

3.3. Statistik

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse und des Student t-Testes durchgeführt (WEBER, 1972).

3.4. ERGEBNISSE

Die quantitative Bestimmung des FSH- und LH-Gehaltes im Medium der Zellkulturen erfolgte in "gepoolten" Proben, d.h., daß je 200 µl Medium von je 12 bovinen bzw. 6 ovinen Einzelkulturen einer Gruppe zu einer Probe zusammengefaßt und im RIA doppelt bestimmt wurden. Aus den RIA-Doppelbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Zur Darstellung der Ergebnisse erfolgte die Umrechnung der Absolutwerte in % der Basalsekretion des jeweiligen Versuchsansatzes.

3.4.1. Steroidgehalt der Testsubstanzen vor und nach der Kohleextraktion.

Die Werte für Östradiol-17 β , Progesteron und Testosteron in den Follikelflüssigkeiten und den Seminalplasmen vor und nach der Steroidextraktion sind in Tab. 4 aufgeführt. Während nach der Extraktion die Östradiol-17 β - und Progesteronkonzentrationen außer in einem Fall (Progesteron in der hFF: 0,52 ng/ml) unter der Nachweisgrenze lagen, betrug die Testosteronmenge in der Follikelflüssigkeit noch zwischen 0,2 und 0,8 ng/ml.

Tab. 4: Steroidgehalt der Testsubstanzen vor und nach der Extraktion.

Testsubstanz	Östradiol-17 β		Progesteron		Testosteron	
	vor	pg/ml / nach	vor	ng/ml / nach Extraktion	vor	ng/ml / nach
bFF	250,0 ⁺	/ 2,5 ⁺⁺	9,6	/ 0,5 ⁺⁺	12,9	/ 0,4
eFF	250,0	/ 2,5	7,5	/ 0,5	3,4	/ 0,4
pFF	250,0	/ 2,5	12,0	/ 0,5	14,1	/ 0,8
oFF	250,0	/ 2,5	11,6	/ 0,5	15,3	/ 0,2
hFF	250,0	/ 2,5	21,0	/ 0,52	7,0	/ 0,2
bSP	19,3	/ 2,5	0,92	/ 0,5	0,16	/ 0,1 ⁺⁺
eSP	2,5	/ 2,5	0,5	/ 0,5	0,16	/ 0,1
pSP	36,8	/ 2,5	0,5	/ 0,5	0,44	/ 0,1
oSP	7,2	/ 2,5	0,5	/ 0,5	0,88	/ 0,1
hSP	7,7	/ 2,5	0,5	/ 0,5	0,61	/ 0,1

+ gleich oder über der Nachweisgrenze 250,0 pg/ml Östradiol-17 β

++ gleich oder unter der Nachweisgrenze 2,5 pg/ml Östradiol-17 β ,
0,5 ng/ml Progesteron oder 0,1 ng/ml Testosteron

3.4.2. Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.

Die Stimulierbarkeit der bovinen HVL-Zellen diente als Parameter für die Fähigkeit der Zellen, Hormone zu produzieren.

Sowohl die FSH- als auch die LH-Sekretion konnte mit GnRH erhöht werden. Der Grad der Stimulierbarkeit war in jedem Versuchsansatz leicht verschieden. In Abb. 1 ist das Sekretionsverhalten der bovinen HVL-Zellen nach GnRH-Gabe aus zwei unterschiedlichen Versuchen dargestellt.

3.4.3. Einfluß von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma verschiedener Spezies auf die basale und GnRH-stimulierte FSH- und LH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.

Die Wirkung von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma von Rind, Pferd, Schwein, Schaf und Mensch auf die basale und GnRH-stimulierte FSH- und LH-Sekretion wurde in mehreren Versuchsansätzen überprüft. Die eingesetzten GnRH-Dosierungen reichten von 10^{-11} M bis 10^{-7} M.

Die basale FSH- und LH-Freisetzung wurde durch die zugegebenen Substrate erhöht, wobei keine Dosisabhängigkeit erkennbar war.

In der mit GnRH stimulierten Kultur war die LH-Sekretion nach Zugabe der Testflüssigkeiten ebenfalls erhöht, während die FSH-Se-



Abb. 1: Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.

kretion gehemmt wurde. Der Grad der Hemmung war nicht von der zugesetzten Dosis abhängig. Wie in Abb. 2 u. 3 sichtbar wird, bewirkte z.B. bFF in den Dosierungen von 3 μ l bzw. 4 μ l den deutlichsten FSH-Abfall.

3.4.4. Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

Die Stimulierbarkeit der ovinen HVL-Zellen durch GnRH diente als Parameter für die Fähigkeit der Zellen, Hormone zu produzieren. Buserelin bewirkte eine von der Dosis abhängige Zunahme der LH-Freisetzung. Diese war nach der Behandlung der Zellen mit der höchsten GnRH-Konzentration von 10^{-8} M gegenüber dem Basalwert um durchschnittlich 142,6 % gesteigert (Abb. 4).

Die FSH-Sekretion wurde durch GnRH geringfügig gehemmt (Abb. 4).

3.4.5. Einfluß von Follikelflüssigkeit verschiedener Spezies auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

3.4.5.1. Bovine Follikelflüssigkeit.

Der Einsatz von ungereinigter bFF in vier und von gereinigter bFF in drei verschiedenen Versuchsansätzen bewirkte eine Hemmung der FSH-Freisetzung. Lediglich in Versuch Nr. 4 lag der FSH-Gehalt im Medium nach Zugabe von 0,001 μ l ungereinigter bFF nicht unter

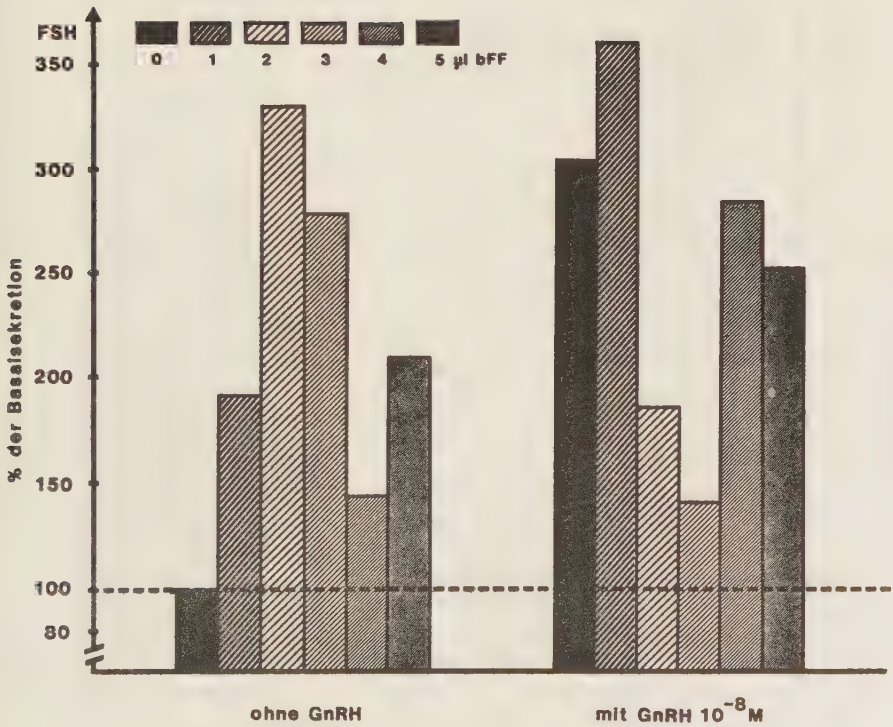


Abb. 2: Einfluß von gereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die FSH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.

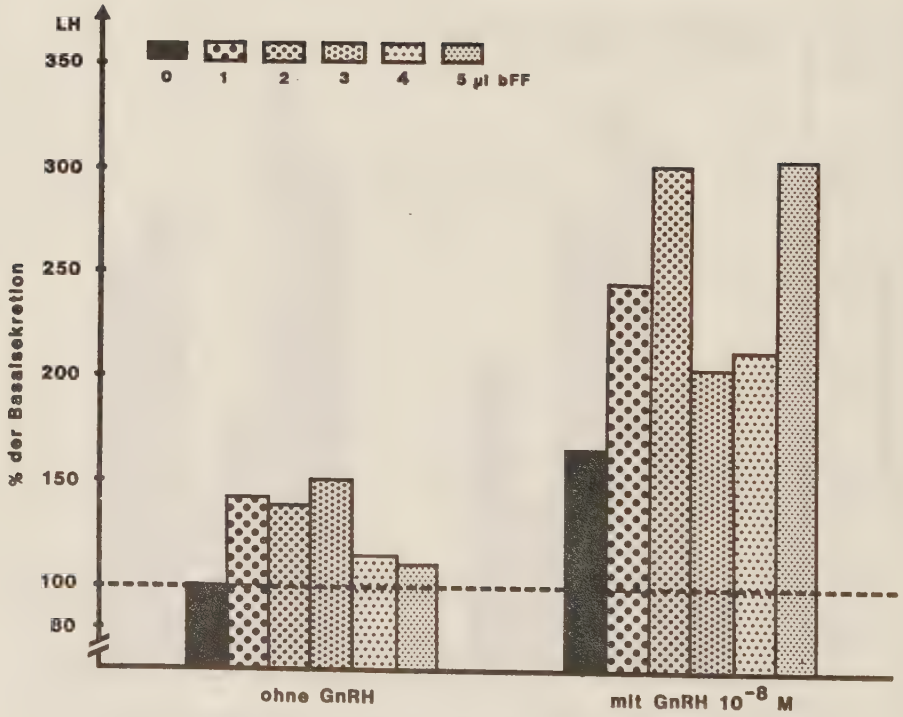


Abb. 3: Einfluß von gereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die LH-Sekretion boviner HVL-Zellen in vitro.

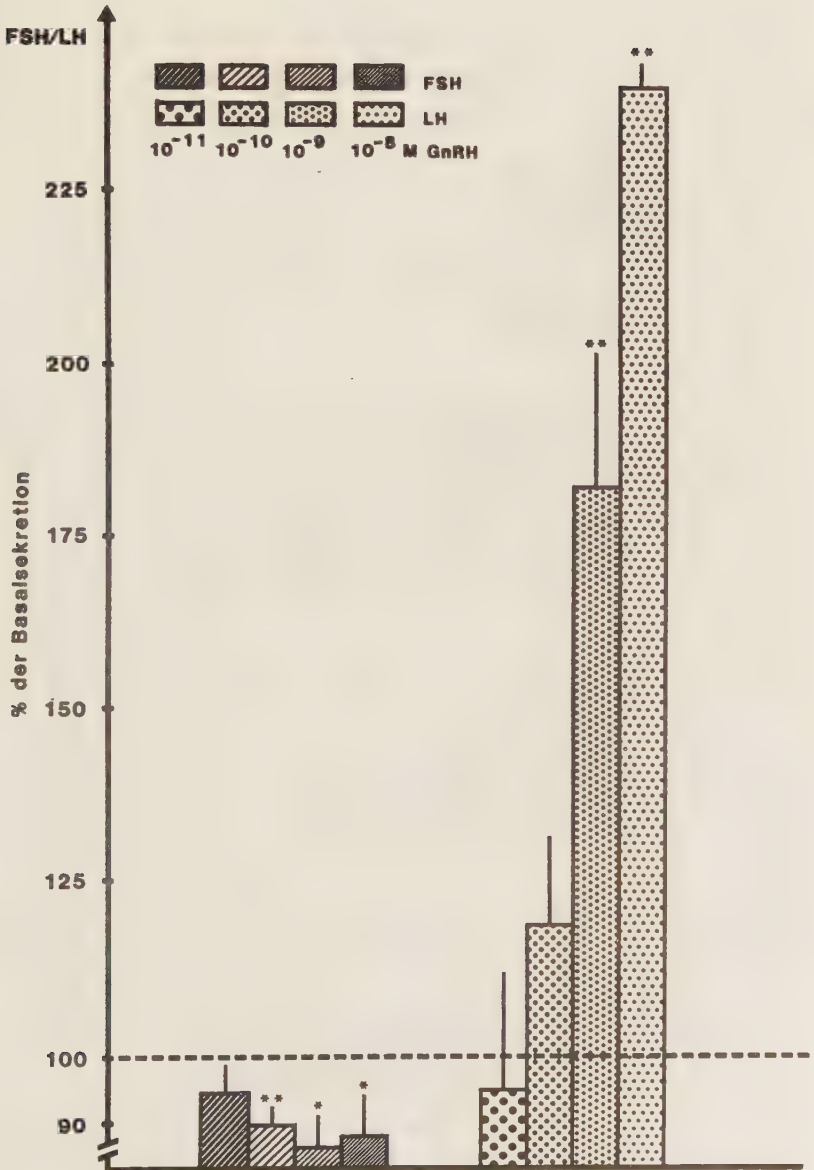


Abb. 4: Einfluß von GnRH (Buserelin) auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro (n = 5; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; t-Test).

dem Basalwert. Die Hemmwirkung der bFF scheint dosisabhängig zu sein. Das Sekretionsverhalten der Zellen wurde in den einzelnen Versuchsansätzen unterschiedlich beeinflusst. Ungereinigte bFF führte in allen Versuchen ab der Dosierung von 0,1 μ l zu einem sehr deutlichen FSH-Abfall. Gereinigte bFF bewirkte bereits in der niedrigsten Konzentration eine gut erkennbare FSH-Hemmung (Abb. 5 u. 6).

Ungereinigte bFF hatte auf die LH-Freisetzung sowohl einen stimulierenden als auch hemmenden Effekt, der keine Dosisabhängigkeit erkennen ließ. In jeweils 2 Fällen war die LH-Sekretion um mehr als 25 % erhöht, bzw. erniedrigt (Abb. 7).

Gereinigte bFF erhöhte die LH-Ausschüttung durch die Zellen so, daß der LH-Gehalt im Medium der Mehrzahl der behandelten Kulturen im Vergleich zum Basalwert um über 100 % stieg (Abb. 8).

3.4.5.2. Equine Follikelflüssigkeit.

Das FSH-Sekretionsverhalten der ovinen HVL-Zellen wurde nach Zusatz von eFF - unbehandelt oder behandelt - sehr ähnlich moduliert. Es kam zu einer Hemmung der Hormonfreisetzung, die in ihrer Intensität von der eFF-Dosis beeinflusst schien (Abb. 9).

Unbehandelte eFF zeigte keinen Effekt auf die LH-Freisetzung, während kohleextrahierte eFF in beiden Versuchen zu einem LH-Anstieg führte. Die LH-Stimulation war in Versuch Nr. 7 ab 0,01 μ l

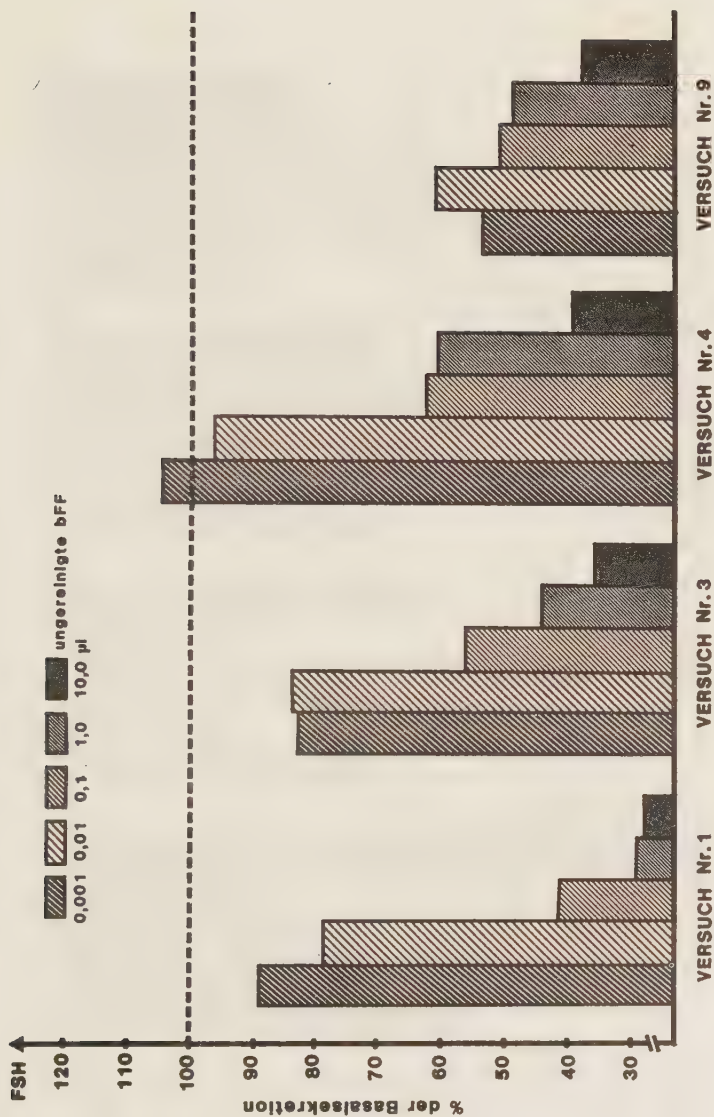


Abb. 5: Einfluß von ungereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

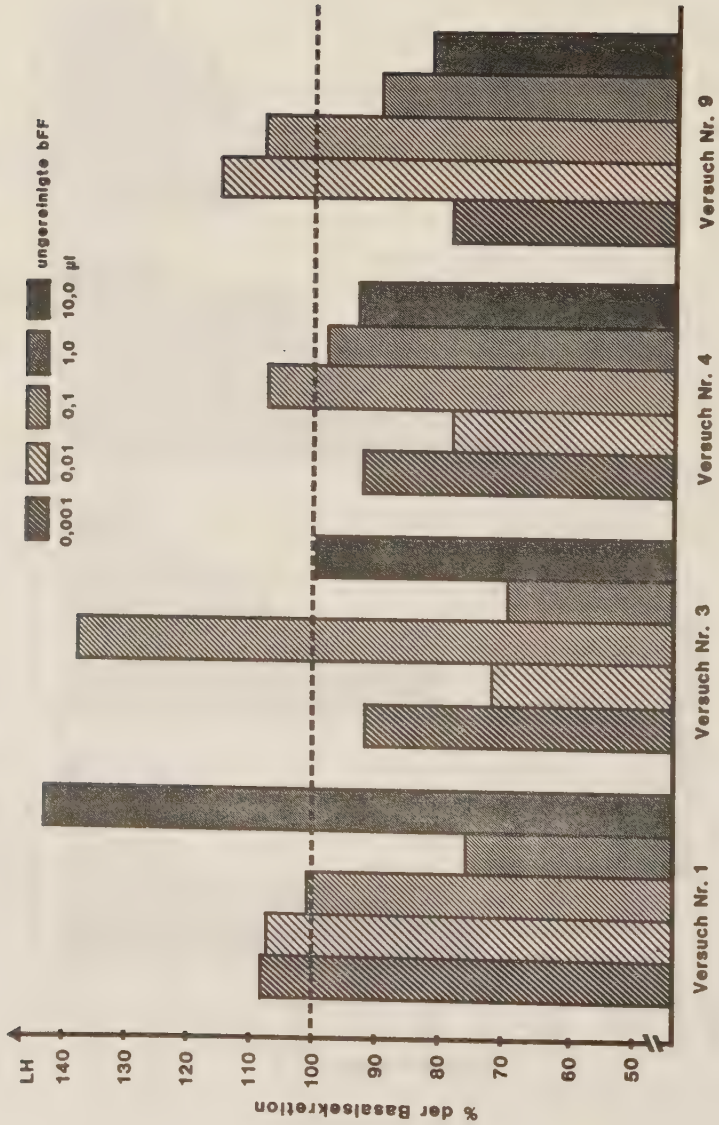


Abb. 6: Einfluß von ungereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

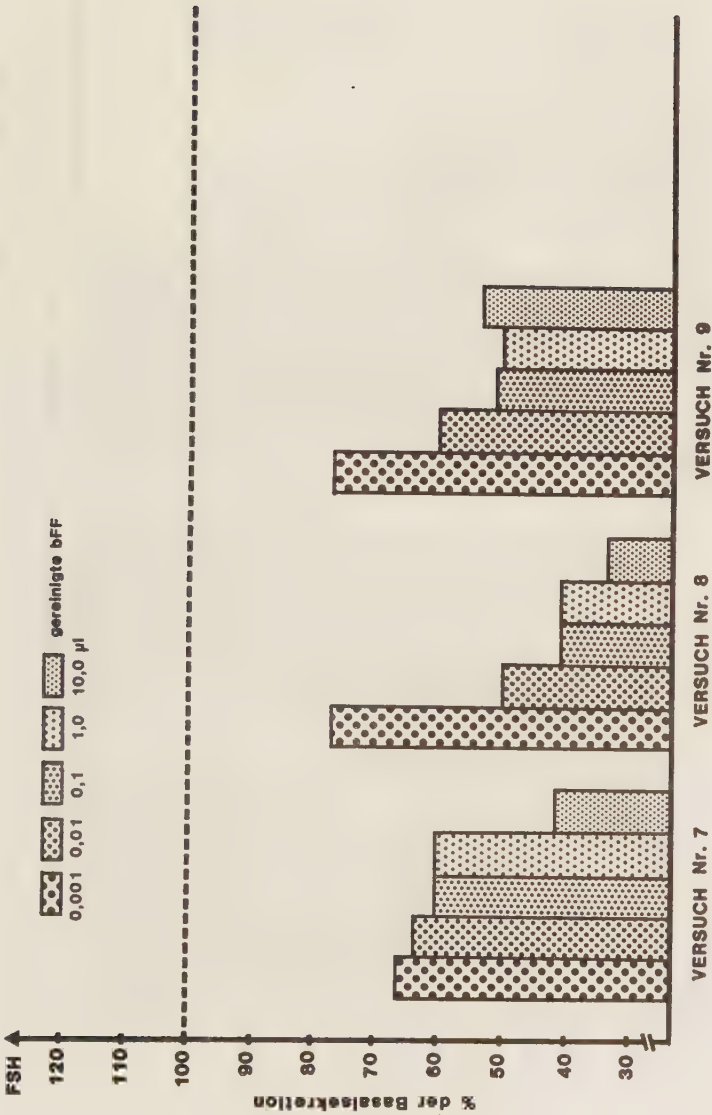


Abb. 7: Einfluß von gereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

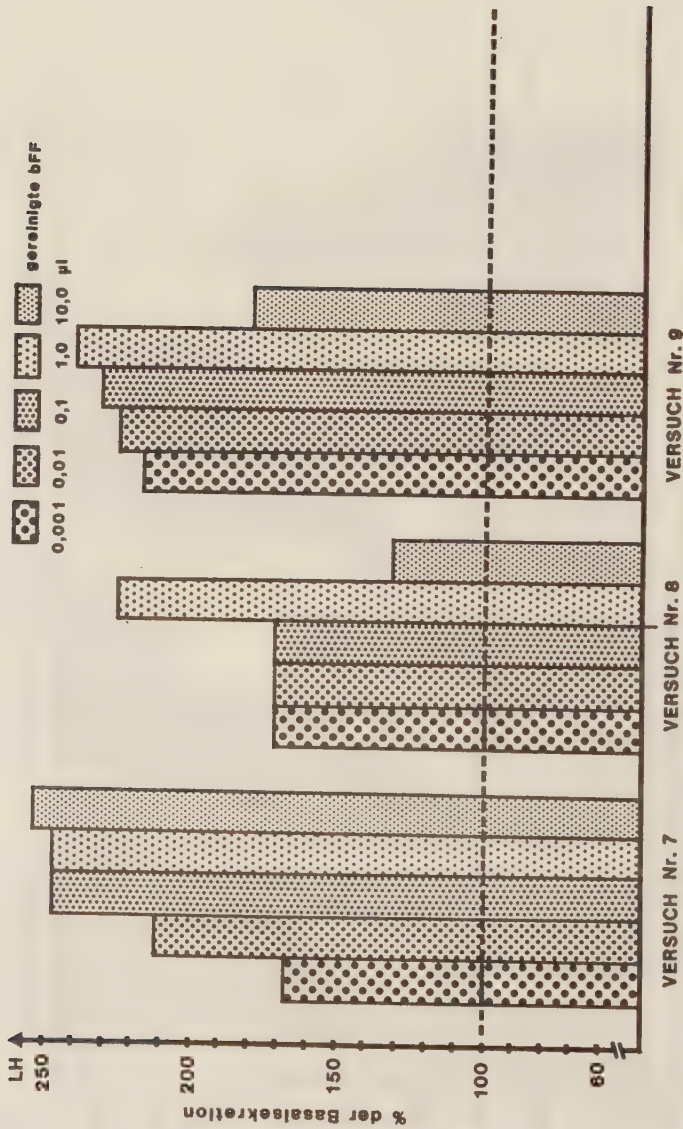


Abb. 8: Einfluß von gereinigter boviner Follikelflüssigkeit (bFF) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

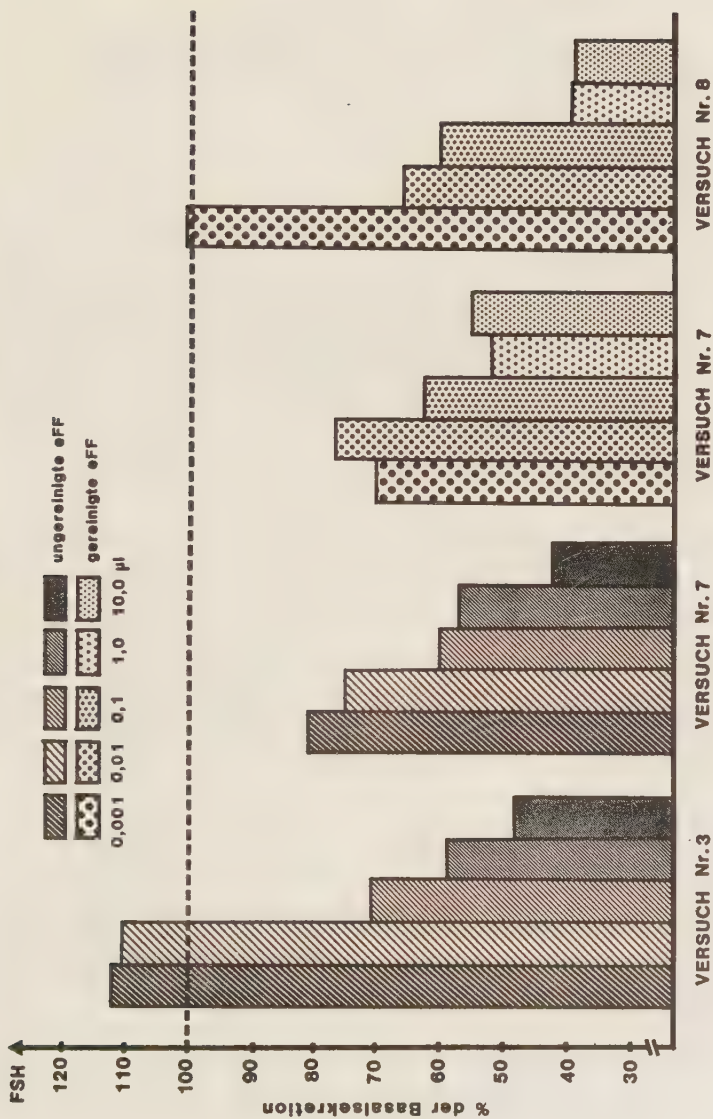


Abb. 9: Einfluß von ungeeigneter und gereinigter equiner Follikelflüssigkeit (eFF) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

eFF deutlich dosisabhängig, konnte aber in Versuch Nr. 8 nur durch 10 μ l eFF herbeigeführt werden (Abb. 10).

3.4.5.3. Porcine Follikelflüssigkeit

Die FSH-Sekretion wurde durch ungereinigte pFF dosisabhängig gehemmt. Während dies in Versuch Nr. 4 erst ab einem pFF-Volumen von 0,1 μ l ersichtlich war, trat der Hemmeffekt in Versuchsansatz Nr. 7 schon in der geringsten Dosierung auf. Auch gereinigte pFF verminderte die FSH-Freisetzung, wobei ebenfalls eine Abhängigkeit von Dosis und Wirkung zu bestehen scheint (Abb. 11).

Der LH-Gehalt im Kulturmedium von Zellen, denen ungereinigte oder gereinigte pFF zugesetzt worden war, zeigte sich sehr moduliert. Es traten sowohl Hemmungen als auch Steigerungen der LH-Sekretion auf. Eine Gesetzmäßigkeit ließ sich nicht erkennen. Der hemmende Effekt war deutlicher ausgeprägt als der stimulierende (Abb. 12).

3.4.5.4. Ovine Follikelflüssigkeit.

Ungereinigte und gereinigte oFF setzten die FSH-Sekretion herab. In Versuch Nr. 7 führten bereits 0,001 μ l ungereinigte oFF zu der nahezu maximalen Hemmung, während in den übrigen Versuchen die Tendenz einer dosisabhängigen Wirkung sichtbar wurde. In der Effektivität, die FSH-Ausschüttung zu unterdrücken, unterschieden sich die beiden verwendeten oFF-Arten nicht (Abb. 13).

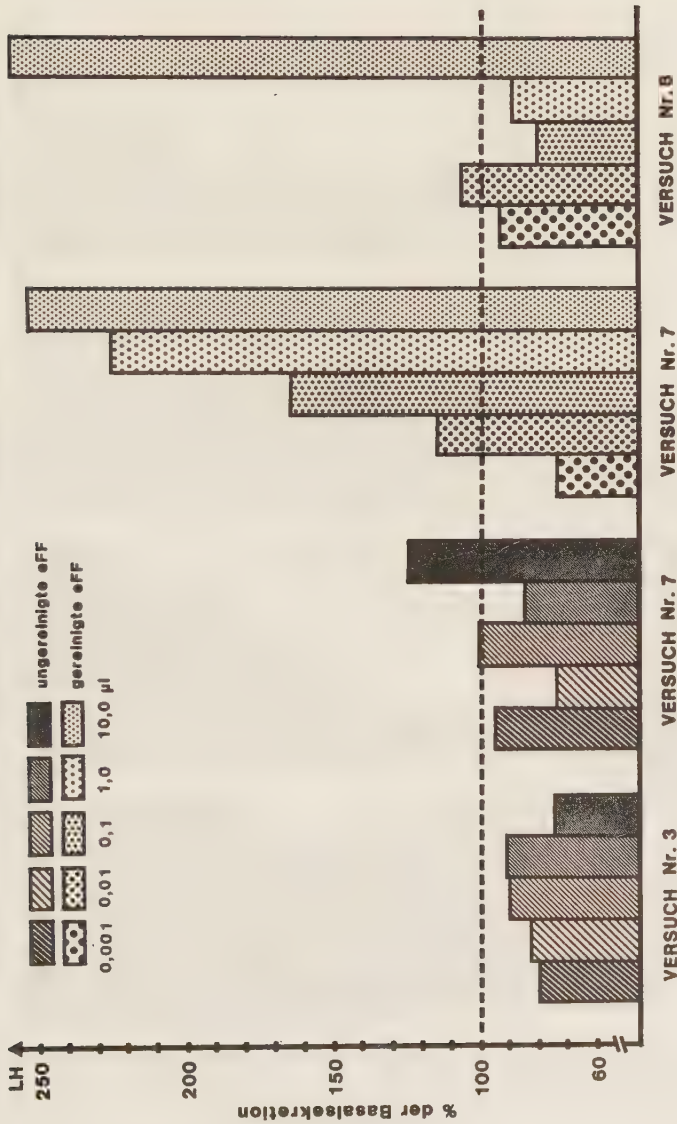


Abb. 10: Einfluß von ungereinigter und gereinigter equiner Follikelflüssigkeit (eFF) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

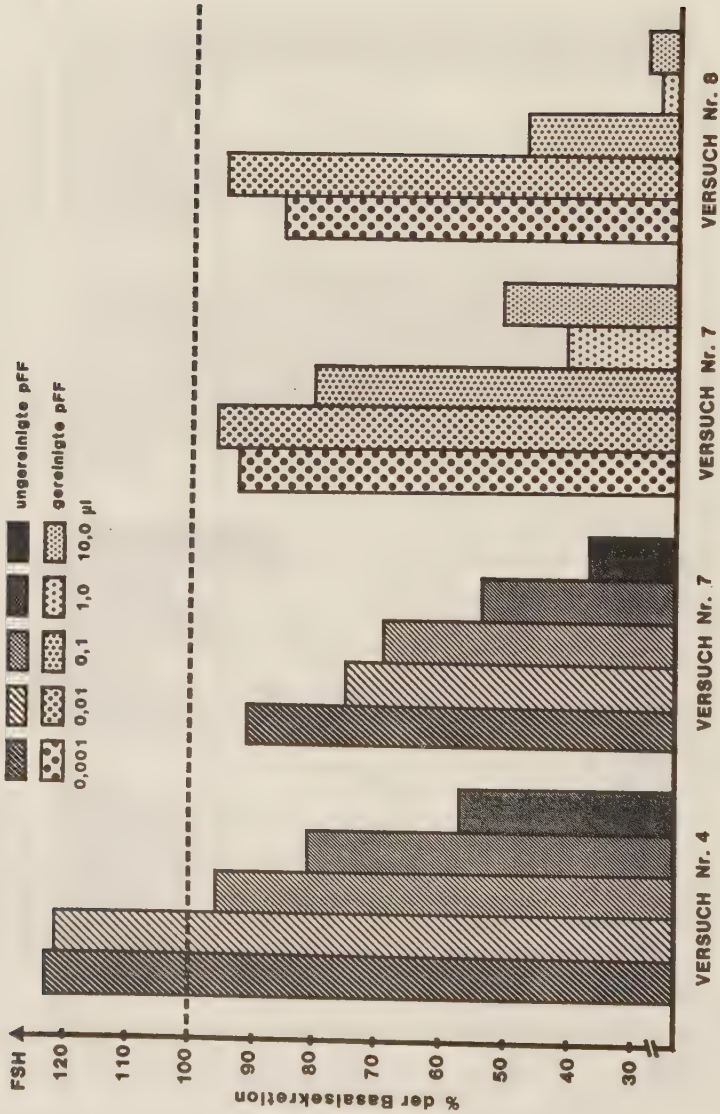


Abb. 11: Einfluß von ungereinigter und gereinigter porciner Follikelflüssigkeit (pFF) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

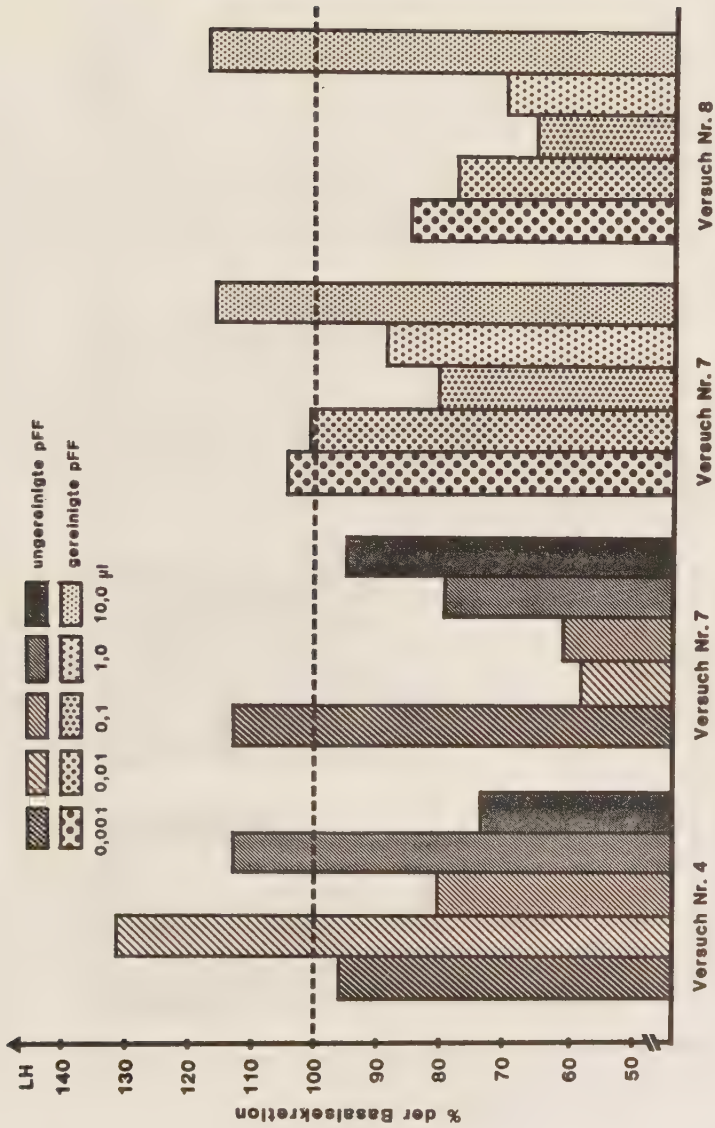


Abb. 12: Einfluß von ungereinigter und gereinigter porciner Follikelflüssigkeit (pFF) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

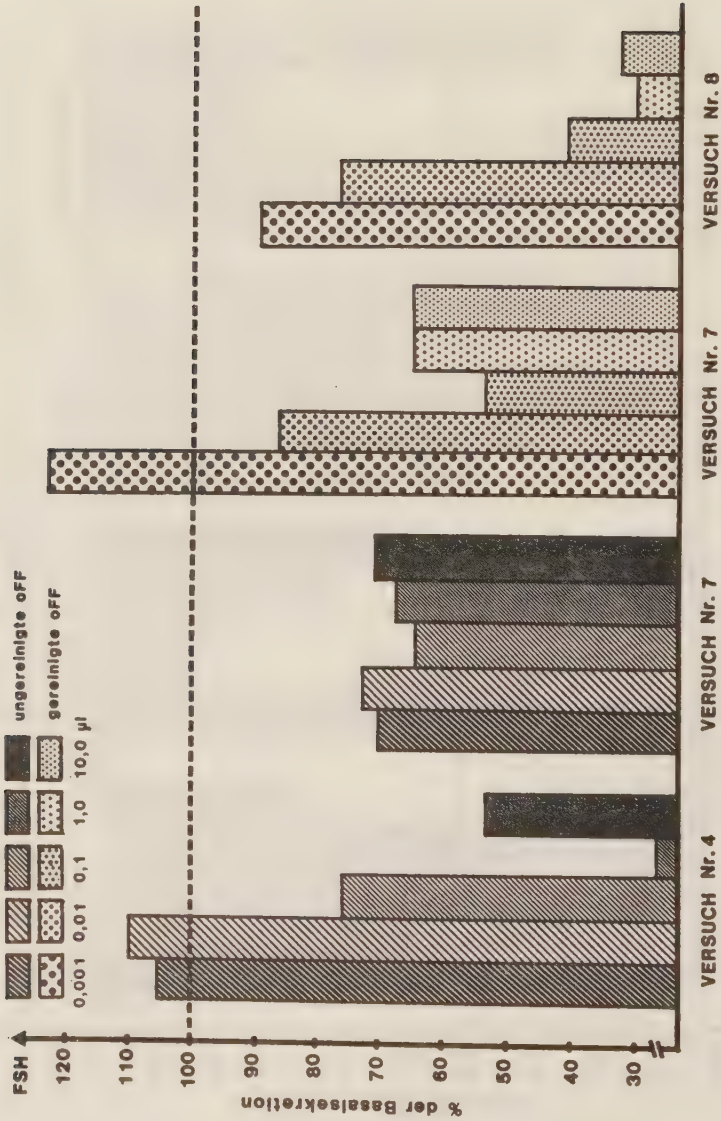


Abb. 13: Einfluß von ungereinigter und gereinigter oviner Follikelflüssigkeit (oFF) auf die FSH-Freisetzung oviner HVL-Zellen in vitro.

In Versuch Nr. 4 bewirkten 0,01 μ l ungereinigte oFF einen LH-Anstieg um fast 70 %, während alle anderen oFF-Volumina zu einer leichten Erniedrigung des LH-Gehaltes führten. In Versuch Nr. 7 blieb die LH-Freisetzung durch ungereinigte oFF in den Dosierungen 0,001 bis 0,1 μ l unbeeinflusst und wurde durch 1,0 und 10,0 μ l oFF stark erhöht. Gereinigte oFF stimulierte die LH-Sekretion (Abb. 14).

3.4.5.5. Humane Follikelflüssigkeit.

Ungereinigte hFF führte in beiden Versuchen zu einer dosisabhängigen Verringerung der FSH-Sekretion. Gereinigte hFF hatte in Versuch Nr. 7 einen leicht stimulierenden und in Versuch Nr. 8 einen hemmenden Einfluß auf FSH (Abb. 15).

Im Gegensatz zu ungereinigter hFF, die die LH-Sekretion in der Tendenz eher durch eine leichte Hemmung beeinflusste, konnte gereinigte hFF eine LH-Stimulation bewirken (Abb. 16).

3.4.6. Einfluß von Seminalplasma verschiedener Spezies auf die FSH- und LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

3.4.6.1. Bovines Seminalplasma.

Die FSH-Sekretion wurde von 0,5 und 1 μ l ungereinigtem bSP gehemmt und von gereinigtem bSP nicht beeinflusst (Abb. 17).

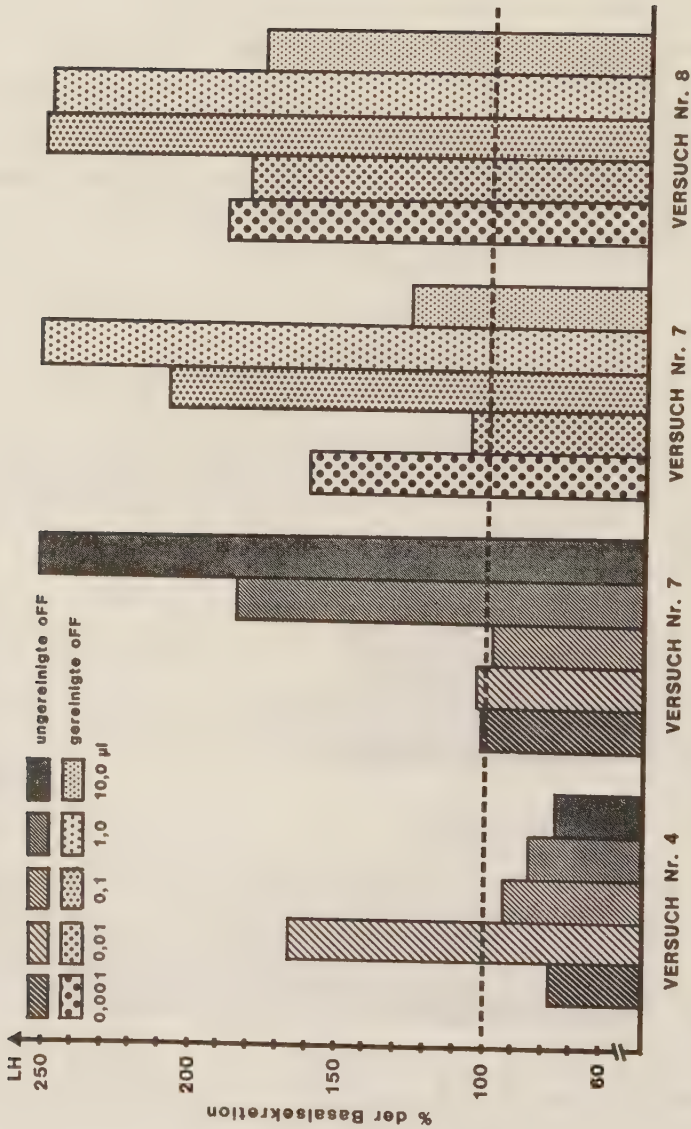


Abb. 14: Einfluß von ungereinigter und gereinigter oviner Follikelflüssigkeit (off) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

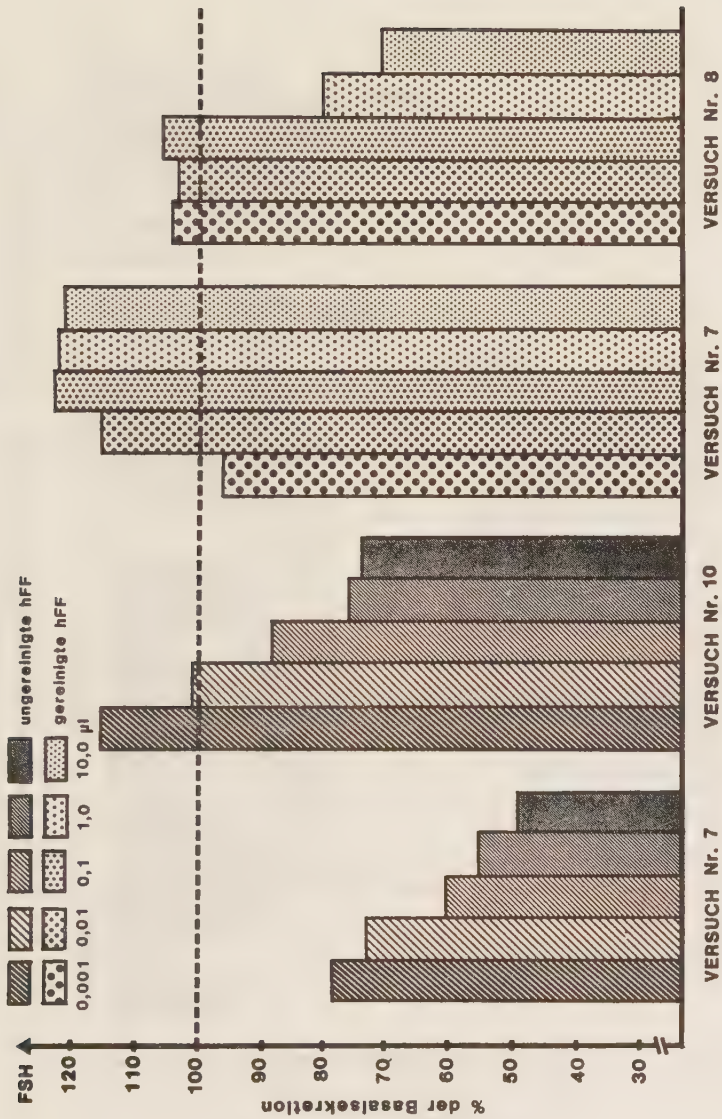


Abb. 15: Einfluß von ungereinigter und gereinigter humaner Follikelflüssigkeit (hFF) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

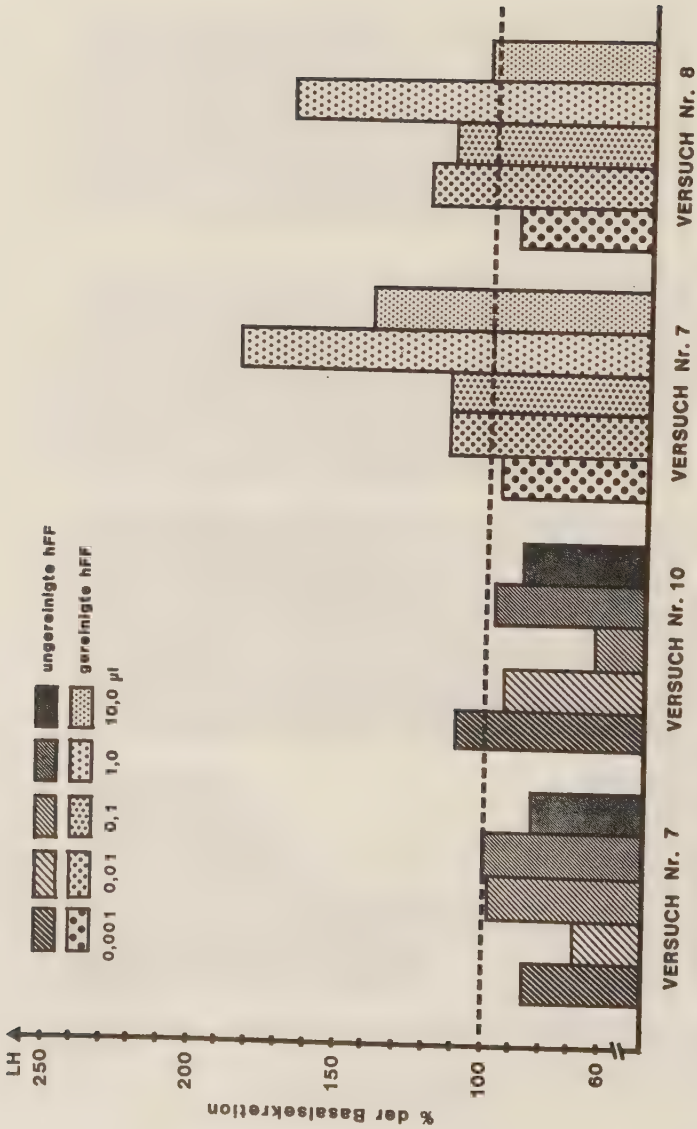


Abb. 16: Einfluß von ungerichtetem und gereinigtem humaner Follikelflüssigkeit (hFF) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

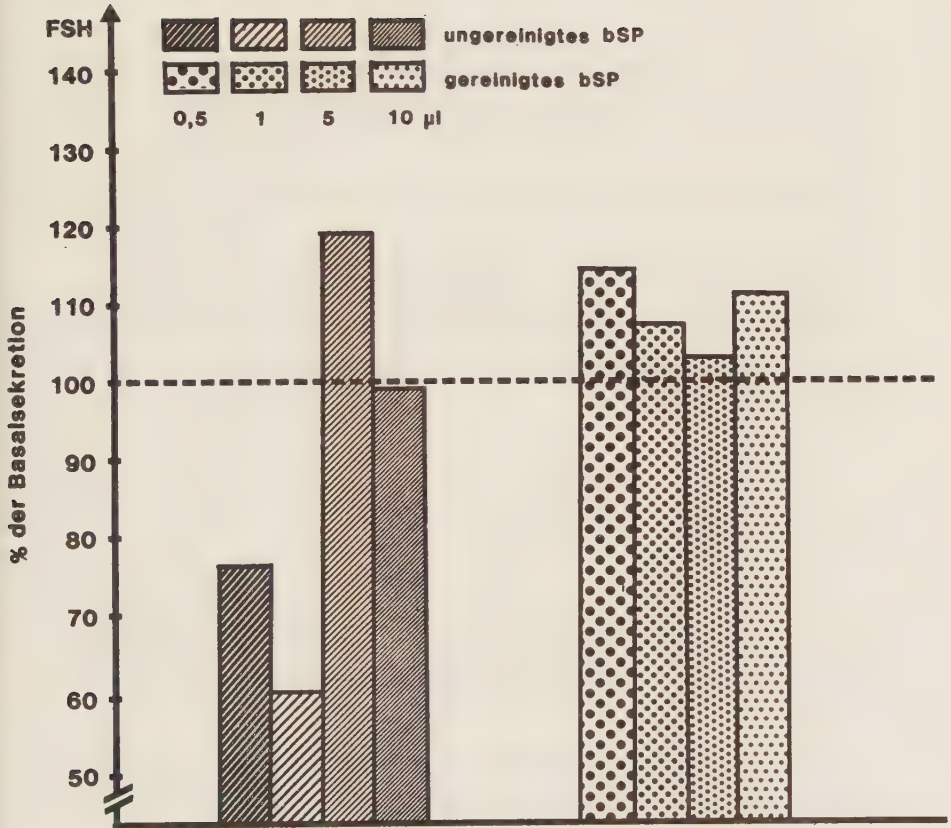


Abb. 17: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem bovines Seminalplasma (bSP) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

Ungereinigtes bSP hatte keinen Effekt auf die LH-Freisetzung, gereinigtes bSP dagegen führte in den Dosierungen 5 μ l und 10 μ l zu einer Stimulation der LH-Sekretion um mehr als 100 % (Abb. 18).

3.4.6.2. Equines Seminalplasma.

Die FSH-Sekretion wurde durch eSP nicht beeinflusst (Abb. 19).

Der LH-Gehalt im Kulturmedium war nach Zugabe von ungereinigtem eSP nicht verändert, während gereinigtes eSP zu einer LH-Stimulation führte. Diese war mit der eSP-Dosierung von 1,0 μ l am höchsten (Abb. 20).

3.4.6.3. Porcines Seminalplasma.

Die FSH-Freisetzung scheint durch ungereinigtes pSP nicht verändert und durch gereinigtes pSP leicht stimuliert (Abb. 21).

Auch LH wurde durch ungereinigtes pSP nicht beeinflusst und durch gereinigtes pSP stimuliert (Abb. 22).

3.4.6.4. Ovines Seminalplasma.

Ungereinigtes oSP führte in den niedrigen Dosierungen zu einem

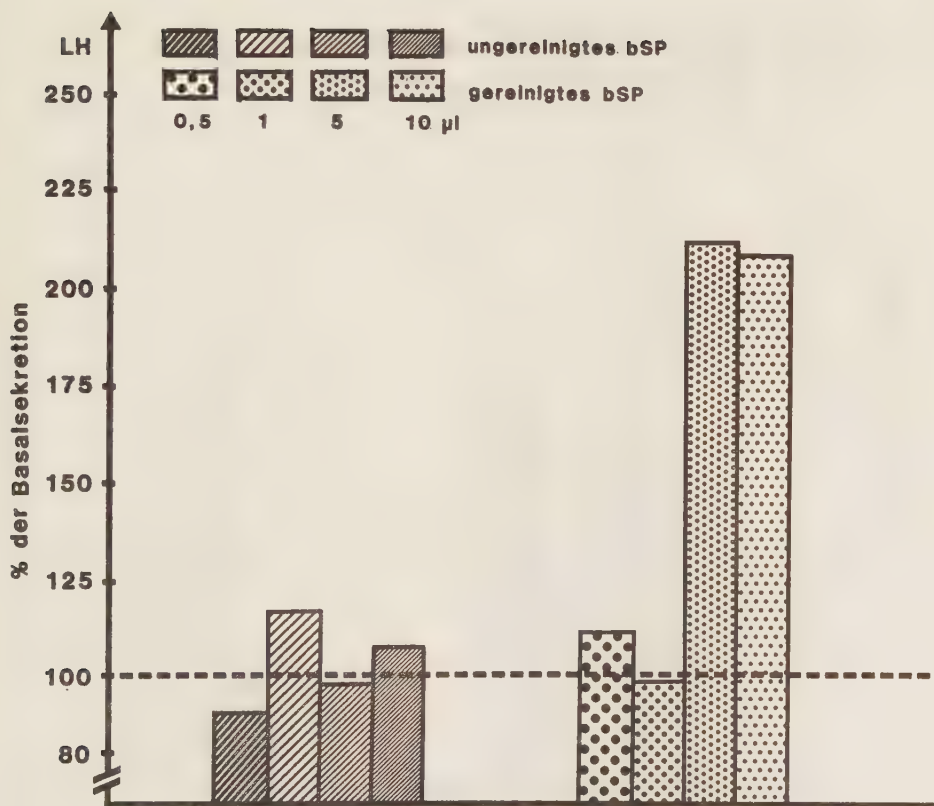


Abb. 18: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem bovines Seminalplasma (bSP) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

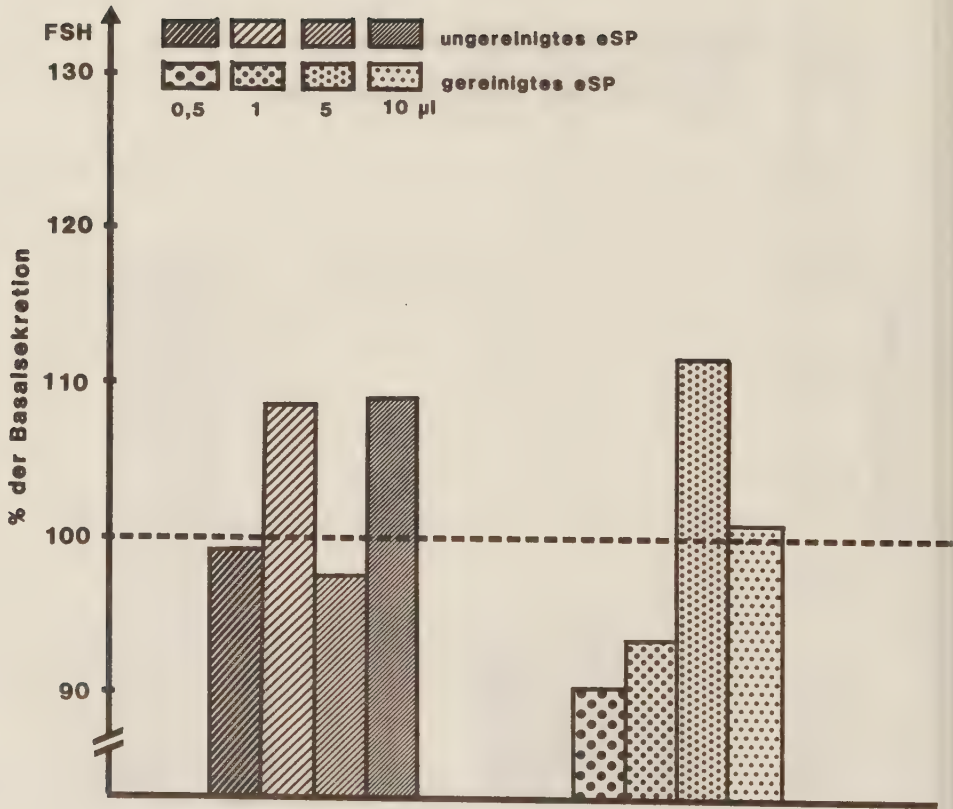


Abb. 19: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem equinen Seminalplasma (eSP) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

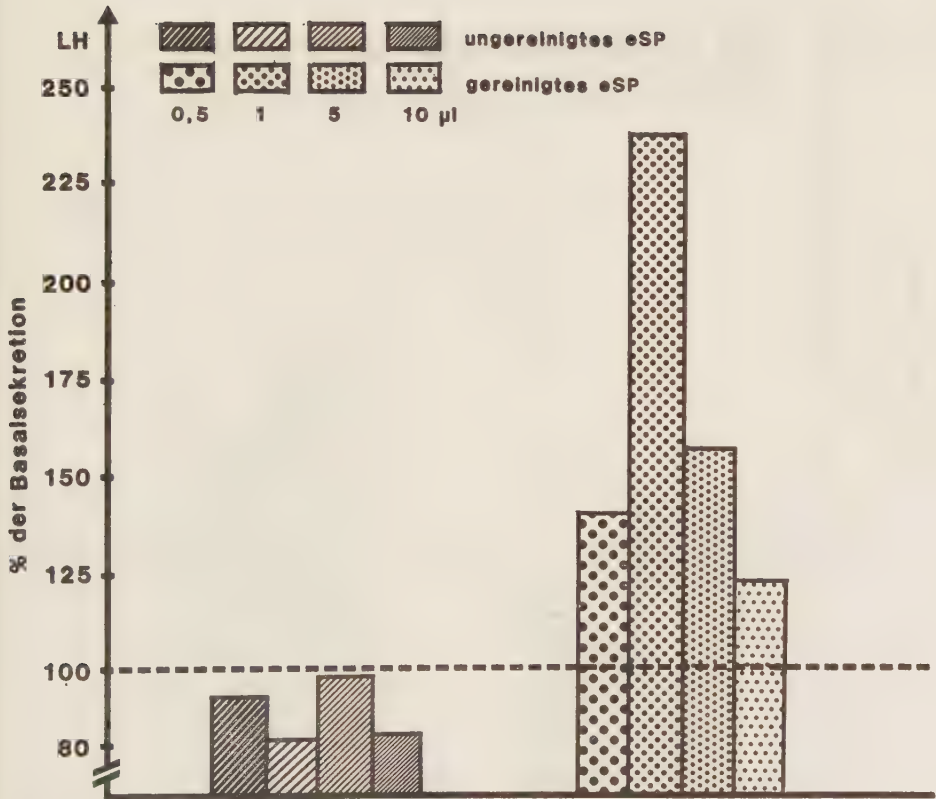


Abb. 20: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem equinen Seminalplasma (eSP) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

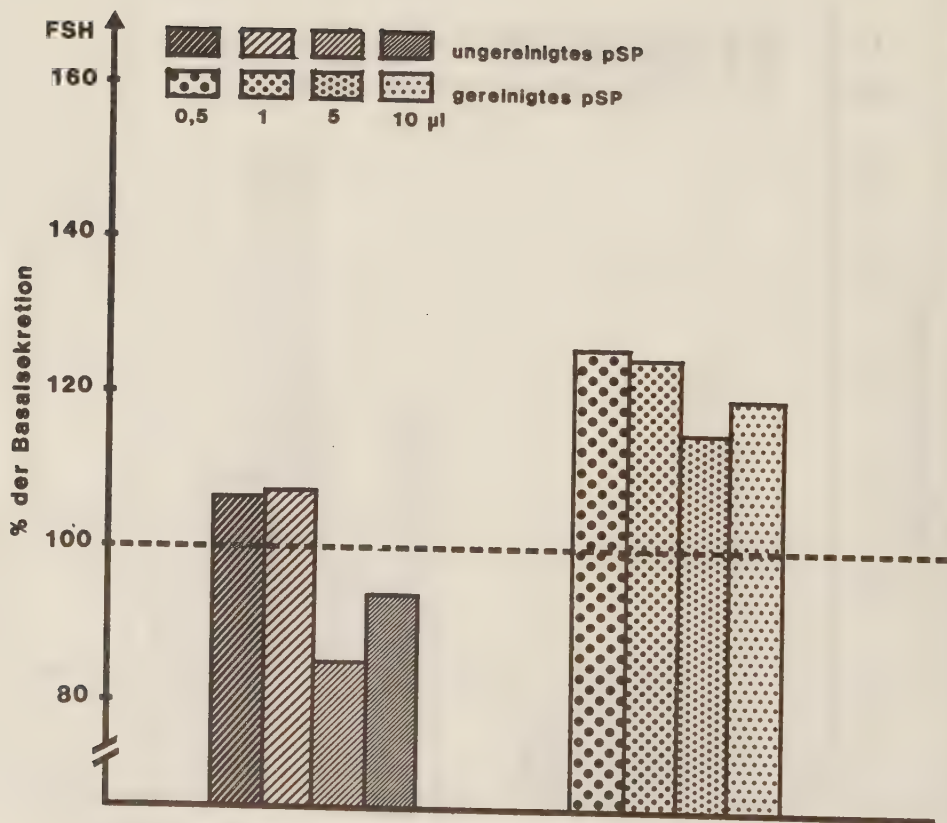


Abb. 21: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem porcinen Seminalplasma (pSP) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

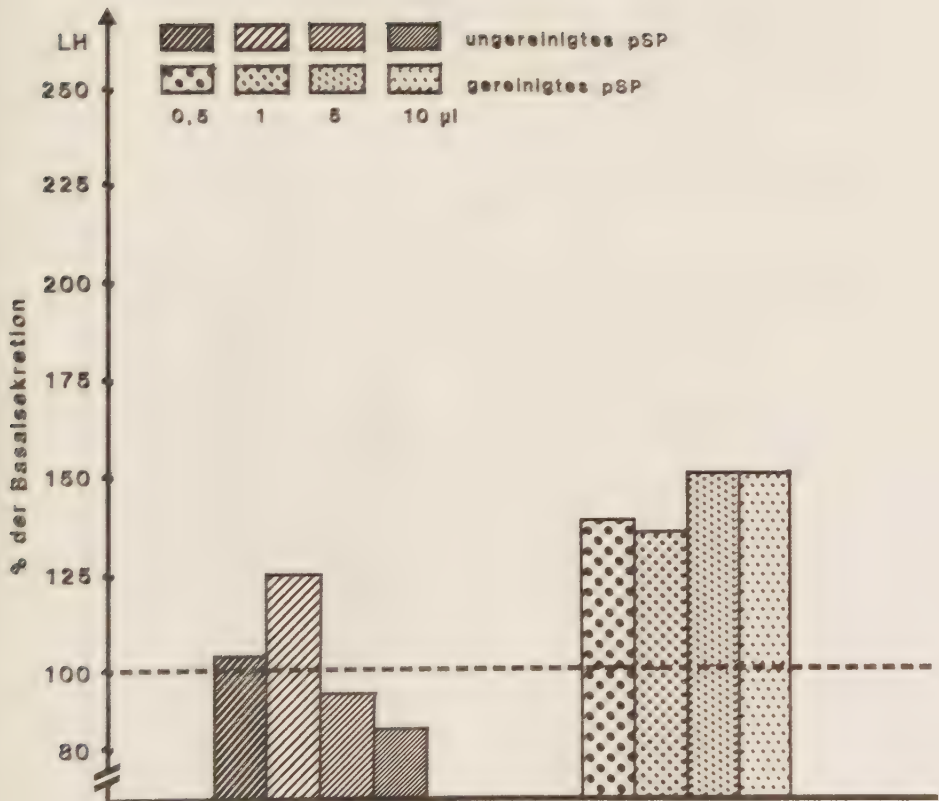


Abb. 22: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem porcinen Seminalplasma (pSP) auf die LH-Sekretion zweier HVL-Zellen in vitro.

deutlichen Anstieg des FSH-Gehaltes im Kulturmedium, während gereinigtes oSP nur leicht stimulierend wirkte (Abb. 23).

Die LH-Sekretion wurde durch ungereinigtes oSP nicht verändert. Nach Zugabe von gereinigtem oSP konnte eine LH-Zunahme im Kulturmedium beobachtet werden (Abb. 24).

3.4.6.5. Humanes Seminalplasma.

Die FSH-Freisetzung wurde durch ungereinigtes und gereinigtes hSP in den Dosierungen 5 μ l und 10 μ l gehemmt (Abb. 25).

Auf die LH-Sekretion hatte hSP - ebenfalls in den Dosierungen von 5 μ l und 10 μ l - einen stimulierenden Effekt (Abb. 26).

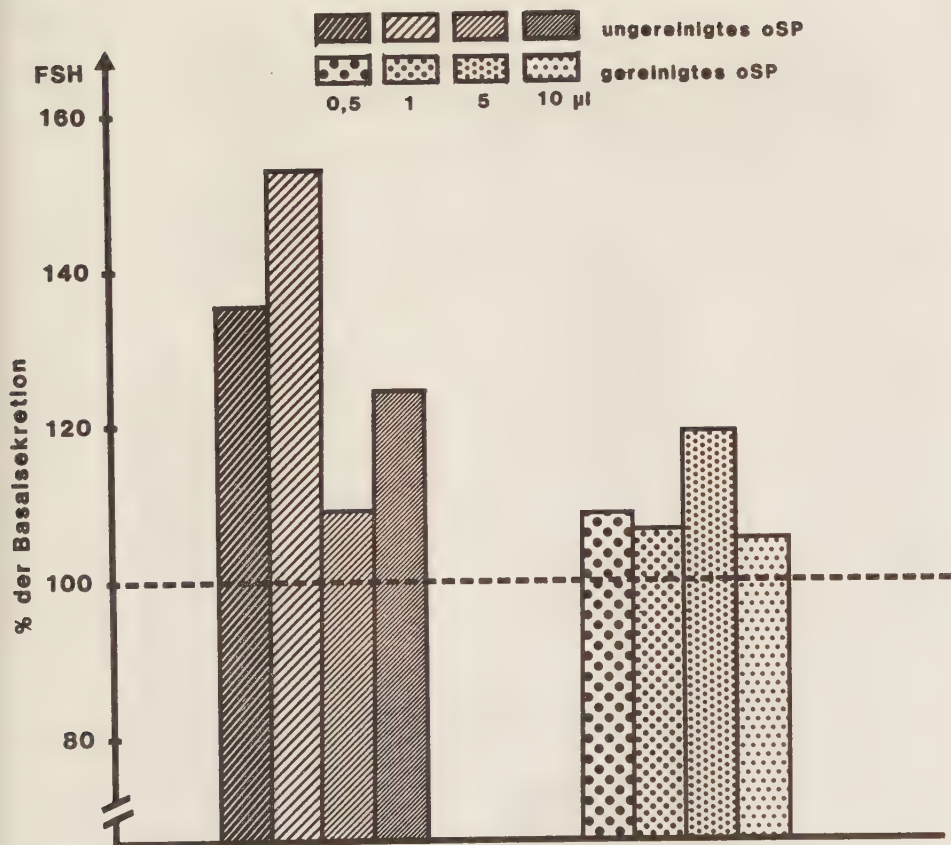


Abb. 23: Einfluß von ungerinigtem und gereinigtem ovinen Seminalplasma (oSP) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

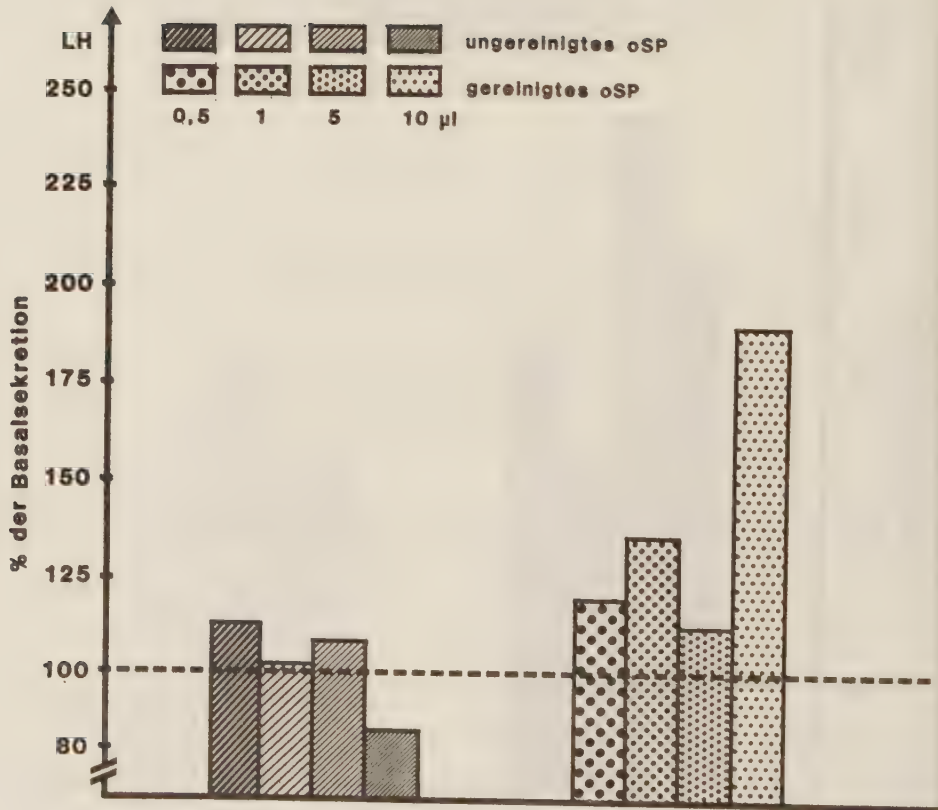


Abb. 24: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem ovinen Seminalplasma (oSP) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

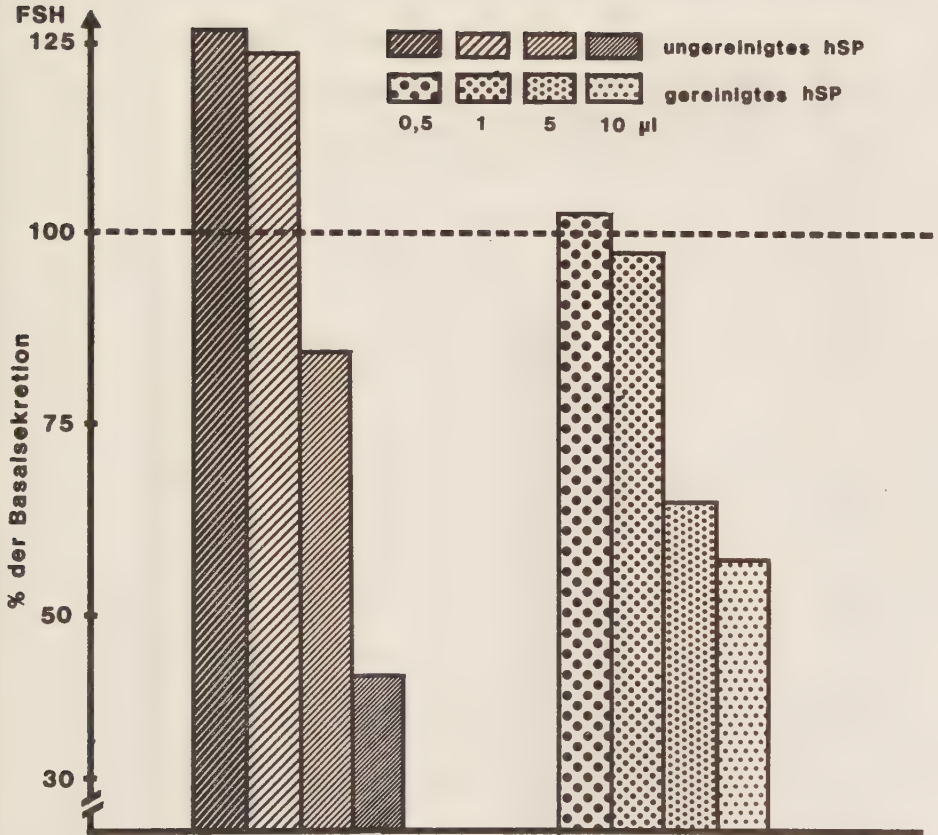


Abb. 25: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem humanen Seminalplasma (hSP) auf die FSH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

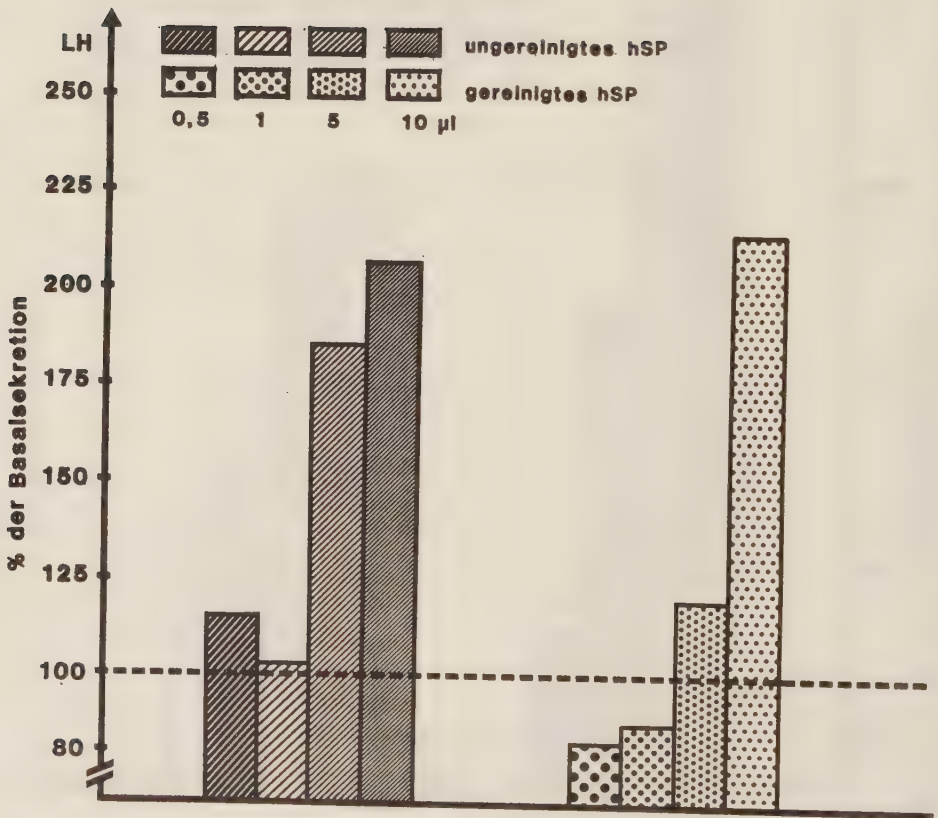


Abb. 26: Einfluß von ungereinigtem und gereinigtem humanen Seminalplasma (hSP) auf die LH-Sekretion oviner HVL-Zellen in vitro.

4. DISKUSSION

Durch zahlreiche Veröffentlichungen ist belegt, daß Follikelflüssigkeit eine selektiv FSH-hemmende Komponente enthält (DE JONG und SHARPE, 1976; BRAUN et al., 1983 a; LING et al., 1985; ROBERTSON et al., 1985; HENDERSON et al., 1986). Im Gegensatz dazu wird der FSH-hemmende Effekt im Seminalplasma kontrovers diskutiert. Auch ist die chemische Identifikation von maskulinem Inhibin bisher nicht geglückt. Zwar berichteten RAMASHARMA et al. (1984) über die Isolation von Inhibin und dessen Replikat aus humanem Seminalplasma, LIU et al. (1985) konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen.

Ein, die Arbeit um das Inhibin erschwerender Faktor ist sicherlich, daß zu seinem Nachweis sehr unterschiedliche In vivo- und In vitro-Bioassay-Systeme verwendet wurden, so daß der direkte Vergleich der Ergebnisse von verschiedenen Arbeitsgruppen oft nicht möglich ist. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Follikelflüssigkeiten und Seminalplasmen verschiedener Spezies in einem Testsystem, nämlich in der HVL-Zellkultur, eingesetzt, um eine vergleichende Bewertung ihrer Wirkung auf die LH- und FSH-Sekretionsrate in vitro anstellen zu können. Ursprünglich sollte für diese Fragestellung die bovine HVL-Zellkultur als Bioassay Verwendung finden, nachdem BRAUN et al. (1983 c) sie als geeignete Methode zur Untersuchung der Inhibinaktivität in der Follikelflüssigkeit vom Rind beschrieben hatten. Sie konnten einen selektiv hemmenden Effekt der bFF auf die mit GnRH 10^{-9} M stimulierte

FSH-Sekretion beobachten. Die Hemmwirkung wurde mit den bFF-Konzentrationen von 1 bis 5 μ l erreicht und stellte sich dosisabhängig dar.

Die Methodik, die für die vorliegende Arbeit benutzt wurde, entsprach der von BRAUN et al. (1983 c). Lediglich die Kohlebehandlung der bFF wurde bei diesen Autoren nach der Methode von WELSCHEN et al. (1977) durchgeführt und für die hier verwendeten Testsubstanzen nach der Methode von TSONIS et al. (1983). Dies geschah, um einem Absinken der Inhibinaktivität in den Follikelflüssigkeiten durch Extraktion mit zu hohen Kohledosen vorzubeugen (BAKER et al., 1978).

In den für diese Arbeit durchgeführten wiederholten Versuchen war die Gonadotropinsekretion der HVL-Zellen grundsätzlich stimulierbar. Eine Dosisabhängigkeit war nicht in allen Fällen gegeben (Abb. 1). Follikelflüssigkeit und Seminalplasma führten im unstimulierten Kultursystem zu einer Steigerung der Gonadotropinfreisetzung. Mit GnRH behandelte Zellen sezernierten nach Zugabe der Substrate vermehrt LH. Der FSH-Gehalt im Kulturmedium war im Vergleich zur Kontrolle häufig erniedrigt. In Abb. 2 und Abb. 3 ist beispielhaft für die erzielten Ergebnisse die Wirkung von bFF in einem Versuchsansatz dargestellt. Der Hemmeffekt in der mit GnRH 10^{-8} M stimulierten Kultur war in den Dosierungen 2 μ l und 3 μ l bFF deutlich sichtbar. Eine Dosis-Wirkungsrelation bestand nicht oder nur bis zur Menge von 3 μ l bFF.

Es war nicht abzuklären, welche Faktoren zu der großen Varianzbreite der Ergebnisse aus den einzelnen Versuchsansätzen führten. Die beschriebene Hemmwirkung von bPF auf die FSH-Sekretion beim Rind in vivo (BRAUN et al., 1983 a) und in vitro (BRAUN et al., 1983 c) ließ darauf schließen, daß es in den hier durchgeführten Versuchen nicht gelang, die Schritte vom Gewinnen der geeigneten Testsubstrate bis hin zur LH- und FSH-Bestimmung im bovinen System zu standardisieren. Aus dieser Erkenntnis resultierte der Entschluß, eine ähnliche Fragestellung in einem anderen In vitro-Bioassay zu untersuchen.

Mit der bovinen HVL-Zellkultur war ein Versuchssystem entwickelt worden, das der Tötung von Tieren ausschließlich zu Versuchszwecken nicht bedurfte. Die Hypophysen von Schlachttieren des örtlichen Schlachthofes konnten verwendet werden. Da auch Schafe zur Schlachtung kommen, war es möglich, unter gleichen tierschützerischen Überlegungen, die Wirkung von unbehandelten und kohleextrahierten Follikelflüssigkeiten und Seminalplasmen verschiedener Spezies in der ovinen HVL-Zellkultur zu überprüfen.

Durch die relativ hohe Anzahl verschiedener verwendeter Testsubstanzen und die nur in begrenztem Maße zur Verfügung stehenden Antiseren zur RIA-Durchführung, sind die Ergebnisse der Versuche mit ovinen Zellen als Durchschnittswerte aus einer Doppelbestimmung gepoolter Medien von sechs Einzelkulturen aufgeführt, so daß diese Resultate nur als eine Aussage in Form eines Screenings angesehen werden können.

Die Methodik der ovinen Zellkultur entsprach weitgehend der, wie sie für Ratten- (CHANNING et al., 1981 c), Rinder- (BRAUN et al., 1983 c) und Schafhypophysen (HUANG und MILLER, 1984) beschrieben ist und geht auf das von VALE et al. (1972) publizierte Systeme zurück. Bei den zitierten Untersuchungen variierte nur die Dauer der einzelnen Kultivierungsabschnitte. In den hier durchgeführten Versuchen folgte auf die 48-stündige Vorinkubationszeit, in der die Zellen Bodenadhäsion aufnehmen und beginnen, das typische Wachstumsbild zu zeigen, die 24-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen. Danach wurde das Zellmedium durch Abpipettieren gewonnen und bis zur Hormonbestimmung tiefgefroren gelagert.

Die in der Literatur angegebenen Vorinkubationszeiten variieren von 18 Stunden (SCOTT et al., 1980) bis 7 Tage (GRAY et al., 1984), die Inkubationszeiten von 3 Stunden (GRAY et al., 1984) bis 4 Tage (CROZE und FRANCHIMONT, 1984). MILLER et al. (1977) beschrieben das In vitro-Verhalten oviner HVL-Zellen über einen Zeitraum von 3 Wochen. Dabei zeigte sich, im Vergleich zur Hypophysenzellkultur anderer Tierarten, eine gut ausgeprägte und lang anhaltende Fähigkeit zur Synthese und Sekretion der Gonadotropine. Am 2. Kultivierungstag hatten 92 % der Zellen Bodenhaftung angenommen und setzten deutliche Mengen an FSH und LH frei.

In der Regel schließt sich an die Inkubationszeit mit den zu testenden Substraten beim Einsatz von GnRH eine 6-stündige Stimulationszeit an (DE JONG et al., 1979 a; HUANG und MILLER, 1984). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma nur bezüglich der Basalsekre-

tion geprüft. Die GnRH-Zugabe zu unbehandelte Zellen erfolgte, um mit der Stimulierbarkeit der Hormonsekretion einen Indikator für die Leistungsfähigkeit der Zellen in vitro zur Verfügung zu haben. Die GnRH-Stimulation erfolgte für 24 Stunden parallel zur Inkubation der Testsubstanzen.

Die dosisabhängig steigernde Wirkung von GnRH auf die hypophysäre Gonadotropinfreisetzung ist vielfach beschrieben. In der bovinen HVL-Zellkultur wurde dieser Effekt durch Buserelin nach 6-stündiger Stimulierungszeit in den Dosierungen $10^{-11}M$ bis $10^{-7}M$ erzielt (BRAUN et al., 1983 c). Bei Untersuchungen von HUANG und MILLER (1980) in der ovinen HVL-Zellkultur erbrachte die maximale Dosierung von $10^{-7}M$ des synthetischen GnRH-Analogons D-Lys⁶-LHRH Triacetat nach ebenfalls 6 h Stimulation einen Anstieg der LH- und FSH-Sekretion um 460 % bzw. 133 %. Im selben Versuch wurde der intrazelluläre Gonadotropin-Gehalt nach der Stimulation bestimmt. Er war, gemessen am Totalhormongehalt (= extrazelluläre + intrazelluläre Hormonmenge), um den Prozentsatz reduziert, um den sich die ins Medium freigesetzte Menge erhöht hatte.

Die Bestimmung des Hormongehaltes im Medium nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen mit Buserelin in den Dosierungen $10^{-11}M$ bis $10^{-8}M$ erbrachte in den hier beschriebenen Versuchen eine dosisabhängige Steigerung der LH-Sekretion auf maximal $+242,9 \pm 7,7$ % der Basalsekretion (Abb. 4). Die Extreme der durch GnRH stimulierten LH-Freisetzung lagen in den 5 Versuchsansätzen zwischen 236,2 % und 252,8 %.

Das Sekretionsverhalten nach GnRH-Stimulation kann - auch im gleichen Versuchsansatz von Zellkultur zu Zellkultur - stark variieren (HUANG und MILLER, 1980). Die Freisetzung von LH ließ sich nach der Erfahrung dieser Autoren um das 4- bis 10-fache, die von FSH um das 1,3- bis 2-fache der Basalsekretion steigern, d.h., es lag eine erhebliche Schwankungsbreite vor.

In den eigenen Versuchen konnte durch steigende Dosen Buserelin keine Stimulation der basalen FSH-Sekretion erzielt werden (Abb. 4). Eine fehlende FSH-Stimulation bei gleichzeitig erhöhtem LH-Gehalt im Kulturmedium ist für HVL-Zellen bisher nicht beschrieben. Als einziger Hinweis auf eine gleichartige Beobachtung liegt die mündliche Mitteilung von BOLT (1986) vor, der ebenfalls bei kultivierten ovinen HVL-Zellen keinen stimulierenden Einfluß von GnRH auf die FSH-Sekretion finden konnte.

Es ist keine Substanz bekannt, die in der Lage ist, die LH-Freisetzung oviner HVL-Zellen selektiv zu steigern. Ein Priming-Effekt von Östradiol-17 β und GnRH auf die Sekretion beider Gonadotropine, der sich bei längerer Inkubationszeit (50 h) für FSH wieder verliert, ist beschrieben (HUANG und MILLER, 1980). Auch in der bovinen HVL-Zellkultur konnte durch Östradiol-17 β nur eine Steigerung der GnRH-induzierten LH- und FSH-Freisetzung festgestellt werden (BRAUN et al., 1983 b). In der Ratten-HVL-Zellkultur konnte dieses Steroidhormon die basale und die GnRH-induzierte Freisetzung beider Gonadotropine erhöhen, die Androgene hem-

mten die LH- und förderten die FSH-Sekretion (LABRIE et al., 1978).

Es war bisher ein akzeptiertes Prinzip der Endokrinologie, daß die FSH-Sekretion auf hypophysärer Ebene durch das Hypothalamushormon GnRH, einen Feedback-Mechanismus mit den gonadalen Steroiden sowie dem Inhibin kontrolliert wird. Vor kurzem haben zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen (LING et al., 1986; VALE et al., 1986) darüber berichtet, daß sie im Rahmen ihrer Versuche, aus pFF Inhibin zu gewinnen, zwei diesem Wirkstoff verwandte Faktoren isolierten, die potente und selektive Stimulatoren der hypophysären FSH-Freisetzung in vitro sind. Sie wurden FSH-releasing protein (FRP) und Activin genannt.

Das FSH-releasing protein (FRP) ist ein 28 KD Polypeptid, zusammengesetzt aus 2 β -Untereinheiten der A-Form des Inhibins (VALE et al., 1986). Das Activin ist ein Polypeptid aus je einer β -Untereinheit der A- und B-Form des Inhibins (LING et al., 1986). Beide stimulieren die Biosynthese und die Sekretion von FSH und haben keinen Einfluß auf LH und Prolaktin.

Die Aktivität der beiden β -Dimere kann von der des GnRH in mehrfacher Hinsicht unterschieden werden: verglichen mit GnRH haben sie keinen Effekt auf die LH-Sekretion, agieren sehr viel langsamer und haben eine größere stimulatorische Wirkung auf FSH. Daraus wird gefolgert, daß sie über andere Rezeptoren, vielleicht über andere Mechanismen als GnRH wirken (TSONIS und SHARPE, 1986).

TSONIS und SHARPE (1986) ließ die Entdeckung der β -Dimere in der pFF vermuten, daß dadurch ein "push-pull"-System in den Gonaden vorhanden sei, das die FSH-Sekretion kontrolliere. Wenn beide, Inhibin und die β -Dimere, den HVL-Zellen zugegeben würden, überwiege der Inhibin-Effekt und die FSH-Sekretion ist gehemmt. Weiterhin folgerten die Autoren, daß das Inhibin in der Follikelflüssigkeit in größeren Mengen als die β -Dimere vorliegt. Die negative FSH-Kontrolle durch die Gonaden sei die prinzipielle Feedback-Aufgabe, wobei dies nicht die Möglichkeit ausschlosse, daß die Sekretion der β -Dimere in den verschiedenen physiologischen Stadien auch dominieren könne. Somit würde durch das Bekanntwerden der β -Dimere oder eines Äquivalentes als zweiter Kandidat der gonadalen Feedback-Kontrolle von FSH ein gründliches Überdenken des endokrinen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreises notwendig.

Welche Rolle dem Activin und FRP dabei zukommt, ist noch nicht faßbar. Es bleibt zum Beispiel zu klären, in wie weit speziesspezifische Komponenten berücksichtigt werden müssen. Vielleicht ist es auch von Bedeutung, ob zum Wirkungsnachweis ein homologes oder ein heterologes Versuchssystem herangezogen wurde. Die Existenz dieser selektiv FSH-hemmenden Faktoren ermöglicht aber die Hypothese, daß unter bestimmten Umständen das GnRH als Stimulator der FSH-Sekretion durch die β -Dimere ersetzt werden könnte.

Betrachtet man den Einfluß der verschiedenen hier verwendeten

Follikelflüssigkeiten hinsichtlich ihrer Wirkung auf die basale FSH-Freisetzung oviner HVL-Zellen in vitro, so wird eindeutig ein hemmender Effekt sichtbar. Die bFF wurde in allen durchgeführten Zellkultivierungen eingesetzt, entweder unbehandelt und/oder kohleextrahiert. In allen Versuchsansätzen war der FSH-Gehalt dosisabhängig vermindert oder eine diesem Effekt entsprechende Tendenz erkennbar. Die Kurven, die sich aus den Mittelwerten der gepoolten Proben ergaben, hatten für ungereinigte und gereinigte bFF einen gleichartigen Verlauf (Abb. 5 u. 6). Ein ähnliches Bild wie für bFF ergab sich auch für eFF (Abb. 9), pFF (Abb. 11), oFF (Abb. 13) und ungereinigte hFF (Abb. 15). Lediglich kohlebehandelte hFF (Abb. 15) hemmte die FSH-Sekretion nur in einem von zwei Versuchsansätzen.

Im Gegensatz zu den meisten Untersuchungen wurde hier die Wirkung der Follikelflüssigkeiten nicht in der GnRH-behandelten Kultur überprüft. SCOTT et al. (1980) und EDDIE et al. (1979) begründen den GnRH-Einsatz in der Ratten-HVL-Zellkultur damit, daß die Dosis-Wirkungskurve durch Follikelflüssigkeit ohne GnRH-Stimulation zu flach verläuft. Auch BRAUN et al. (1983 c) untersuchten aus diesem Grund den Einfluß von bFF auf die GnRH-induzierte Gonadotropinfreisetzung in der bovinen Zellkultur. Der Zusatz einer steroidarmen pFF-Präparation zu ovinen HVL-Zellen erbrachte eine eindeutige Hemmung der basalen und GnRH-stimulierten FSH-Ausschüttung (ROBERTSON et al., 1986). Es schien deshalb gerechtfertigt, die Hemmwirkung der hier eingesetzten Substanzen auf die Basalsekretion zu untersuchen.

Die maximale Suppression der FSH-Sekretion betrug für - jeweils ungereinigt und gereinigt - bFF 72,4 % bzw. 66,1 %, für eFF 57,8 % bzw. 60,6 %, für pFF 63,0 % bzw. 76,2 %, für oFF 76,7 % bzw. 69,7 % und für hFF 51,2 % bzw. 29,8 %, so daß die Basalsekretion als Bezugsgröße zur Messung der FSH-Hemmung in der ovinen HVL-Zellkultur als geeignet betrachtet werden kann. Daß die Hemmung nicht auf einen toxischen Effekt zurückzuführen ist, belegen die LH-Werte (s. später).

Die Extraktion der Steroidhormone hatte keinen Einfluß auf die FSH-hemmende Eigenschaft der bovinen, equinen, porcinen und ovinen Follikelflüssigkeit. Die FSH-Werte der beiden Versuchsansätze, in denen gereinigte hFF derselben Charge den Zellen zugegeben worden war, stellten sich nicht einheitlich dar. Einer Stimulation von ca. 20 % beim ersten Ansatz steht eine Hemmung von 29,8 % im zweiten Ansatz gegenüber (Abb. 15). Diese Varianzbreite der Resultate in der ovinen Kultur ist eventuell, ähnlich wie im bovinen System, auf methodische Faktoren zurückzuführen.

Der Einfluß der Steroidhormone bei der Verwendung von Follikelflüssigkeit zur Überprüfung der Gonadotropinsekretion der Hypophyse wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. In neueren Veröffentlichungen erbrachte der vergleichende Einsatz von gereinigter und ungereinigter Follikelflüssigkeit keine Hinweise dafür, daß die beobachtete FSH-Hemmung auf einer Steroidwirkung beruht (FUJI et al., 1983; MC NEILLY, 1984; PADMANABHAN et al., 1984; MILLER und BOLT, 1985 b). Über analoge Untersuchungen in

der ovinen HVL-Zellkultur liegen keine Arbeiten vor. Die oben zitierten Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, daß die geringen Mengen Steroidhormone in den Substraten keine Rolle spielen.

Stellt man die Wirkung der Follikelflüssigkeit auf die FSH-Sekretion jener auf die LH-Sekretion gegenüber, so wird die selektive FSH-Hemmung deutlich. Keine der eingesetzten Follikelflüssigkeiten war in der Lage, die basale LH-Ausschüttung in dosisabhängiger Weise zu vermindern (Abb. 5, 9, 11, 13, 15). Auf die teilweise stark erhöhten LH-Werte soll später eingegangen werden.

Die Fähigkeit, die hypophysäre FSH-Sekretion in vivo und in vitro zu hemmen, wird dem in den Granulosazellen des Ovars gebildeten und in der Follikelflüssigkeit enthaltenen Proteohormon Inhibin zugesprochen. Aus den hier beschriebenen Ergebnissen lässt sich folgern, daß das Inhibin sowohl in der unbehandelten als auch in der kohleextrahierten Follikelflüssigkeit von Rind, Pferd, Schwein, Schaf und Mensch enthalten und in der Lage ist, die basale FSH-Freisetzung aus ovinen HVL-Zellen in vitro dosisabhängig zu hemmen, wobei keine eindeutigen speziesspezifischen Unterschiede erkennbar sind.

Keine der verwendeten nativen Follikelflüssigkeiten konnte die LH-Sekretion dosisabhängig beeinflussen, während sie nach Kohlebehandlung - von pFF abgesehen - eine deutliche LH-Stimulation hervorriefen (Abb. 6, 8, 10, 12, 14, 16).

Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Autoren, die sich ebenfalls mit der Modulation der LH- und FSH-Sekretion durch steroidhormonfreie Follikelflüssigkeit beschäftigt haben und entweder keine Beeinflussung der basalen (HUANG und MILLER, 1984) oder ein Absinken der GnRH-induzierten LH-Sekretion in vitro fanden (HENDERSON und FRANCHIMONT, 1981). Nach Zusatz von 3 µl gereinigter bFF zu GnRH-stimulierten bovinen HVL-Zellen beobachteten BRAUN et al (1983 c) einen signifikanten LH-Anstieg. HUANG und MILLER (1984) beschrieben im ovinen In vitro-HVL-System gleichfalls nur in Verbindung mit GnRH eine Erhöhung der LH-Sekretion durch kohleextrahierte lyophilisierte pFF. Als Erklärung für ihre Ergebnisse nennen die Autoren das Vorhandensein einer GnRH-aktivierenden Substanz in der pFF. Sie weisen darauf hin, daß gewöhnlich die Ratten-HVL-Zellkultur zur Untersuchung der FSH-hemmenden Aktivität in der Follikelflüssigkeit benützt wird und ihre Ergebnisse vielleicht wesentliche Unterschiede in der Antwort von Schaf- und Rattenhypophyse auf pFF aufzeigen. Als Beispiel speziesverschiedener Reaktionen nennen sie den positiven Einfluß von Östrogen-17ß auf die GnRH-Wirkung bei HVL-Zellen von Ratten, verglichen mit dem negativen Einfluß in den Kulturen von Schafen und Rindern.

MILLER und BOLT (1985 a) konnten an kastrierten weiblichen Schafen einen LH-stimulierenden Effekt weder mit ungereinigter noch mit kohlebehandelter pFF belegen. Sie verwiesen auf die Möglichkeit, daß die unterschiedlichen Ergebnisse durch die relativen Dosen von pFF und GnRH oder nicht identifizierte Verschiedenheiten von In vivo- und In vitro-Bioassay-Systemen begründet sein könnten.

WALLACE und MC NEILLY (1985) berichten, daß die Verabreichung von 2-mal tgl. 10 ml kohleabsorbierter bFF an Schafe vom Tag 0 (Ovulation) bis Tag 11 des Zyklus während des ganzen Versuchszeitraumes zu einer erhöhten LH-Plasmakonzentration führte - bei gleichzeitiger FSH-Hemmung. Die detaillierte Analyse der LH-Sekretion am Tag 8 des Versuches erbrachte neben einem Anstieg der basalen Konzentration eine Erhöhung der Frequenz und Amplituden der pulsilen LH-Freisetzung. Eine analoge Wirkung ergab die Immunisierung zyklischer Schafe gegen Androstenedion und Östradiol-17 β , die als Folge des durch die Immunisierung bewirkten Verlustes des negativen Feedbacks von Östradiol-17 β mit LH interpretiert wurde. Den Autoren schien denkbar, daß die niedrigen FSH-Spiegel nach bFF-Applikation zu einer verringerten Östradiol-17 β -Produktion in den Follikeln führten. Das Fehlen des negativen Feedbacks mit LH war ihrer Meinung nach auch die Ursache für die Zunahme der pulsilen LH-Freisetzung.

Vergleicht man die Experimente von MILLER und BOLT (1985 a) und WALLACE und MC NEILLY (1985), so könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse die Verwendung von zyklischen und ovariektomierten Schafen und damit der vorhandene oder fehlende Einfluß der gonadalen und hypophysären Feedback-Mechanismen verantwortlich sein.

Diese Erklärung kann für das In vitro-System nicht übernommen werden. Wenn dem Östradiol-17 β in der bFF eine Rolle bei der Regulierung der LH-Freisetzung zukäme, müsste sich dies in einer

Erniedrigung der LH-Werte nach Inkubation der Zellen mit steroidhaltiger bFF widerspiegeln, da der Basalwert der In vitro-Sekretion nicht von Östradiol-17 β im peripheren Blut beeinflußt wird.

Denkbar wäre das Vorhandensein einer Substanz in der Follikelflüssigkeit, die die LH-Freisetzung der ovinen HVL-Zellen steigert und mit den Steroidhormonen interagiert, so daß sie in der ungereinigten Follikelflüssigkeit nicht zur Wirkung kommt. Verstärkt wird diese Hypothese durch die hier beschriebenen Befunde, da nur gereinigte pFF die LH-Sekretion nicht erhöhte und in der pFF nach Kohleextraktion mit 0,8 ng/ml die höchste Testosteronkonzentration gemessen wurde. Ob diese LH-stimulierende Substanz auf die GnRH-sensibilisierte oder basale LH-Sekretion wirkt, ist vielleicht eine Frage der Dosierung. HUANG und MILLER (1984) setzten μ g-Dosierungen der lyophilisierten pFF ein und machen keine Angaben über die μ g/ μ l-Beziehung, so daß ein direkter Vergleich mit den hier gewählten Mengen nicht möglich ist.

Eventuell stellt sich gerade auch bei pFF der LH-freisetzende Effekt nur in Anwesenheit von GnRH ein, so daß hier ein speziesspezifischer Unterschied vorliegt. Dies müsste durch den Einsatz der Follikelflüssigkeiten in der GnRH-behandelten Kultur überprüft werden.

Natives und steroidhormonfreies Seminalplasma von Hengst, Eber und Schafbock modulierten die FSH-Freisetzung nicht deutlich (Abb. 19, 21, 23). Ungereinigtes bSP - in den niedrigen Dosen

von 0,5 μ l und 1 μ l - und hSP - in unbehandelter und gereinigter Form - führten zu einer FSH-Hemmung (Abb. 17 u. 25).

Die LH-Sekretion wurde durch kohleextrahiertes Seminalplasma aller überprüften Spezies und durch natives hSP gesteigert. Die starken Schwankungen der modulierten LH-Freisetzung waren nicht eindeutig mit den eingesetzten Dosierungen oder der Steroidextraktion in Zusammenhang zu bringen (Abb. 18, 20, 22, 24, 26).

BRAUN et al. (1980) beobachteten bei ovariectomierten Kalbinnen nach Injektion eines durch Ethanol-Aceton-Fällung gewonnenen Rohextraktes aus bSP ebenfalls in der niedrigsten Dosierung (0,125 g) einen Abfall der FSH-Blutplasmakonzentration. MIYAMOTO et al. (1985 b) inkubierten die nach Acetonpräzipitation und Lyophilisation erhaltenen Proteine aus Bullen-, Eber- und Ziegenseminalplasma zusammen mit ganzen Maushypophysen und konnten eine dosisabhängige Hemmung der GnRH-induzierten FSH-Freisetzung feststellen. Auch die LH-Sekretion war teilweise signifikant unterdrückt.

Bei der Durchführung der Versuche war auffällig, daß sowohl bSP als auch hSP in den Dosierungen ab 5 μ l die Zellaktivität gegen Ende der Kultivierungszeit beeinflussten. Neben einer Abnahme des pH-Wertes war ein fauliger Geruch wahrnehmbar und die Zellen verloren die Bodenhaftung am Kulturgefäß. Diese Erscheinungen traten auch nach Sterilfiltration des Seminalplasmas auf, so daß auf eine virale Kontamination geschlossen werden kann. Der unveränderte (Abb. 18) oder deutlich erhöhte LH-Gehalt im Kulturmedium (Abb.

18 u. 26) widerlegte die Vermutung, daß die erniedrigten FSH-Werte durch bSP und hSP als Folge der oben beschriebenen Beobachtungen auftraten. Sichtbare Veränderungen an den Zellen traten erst kurz vor dem Abpipettieren des Kulturmediums zur Hormonbestimmung auf. Wahrscheinlich verlief die Gonadotropinsekretion den längsten Kultivierungsabschnitt über ungestört. Als Ursache des FSH-Abfalles kommt demnach der einzige bekannte selektiv FSH-hemmende Faktor - das Inhibin - in Betracht. Dagegen spricht nicht, daß bei bSP der Hemmeffekt nur in den niedrigen Dosen sichtbar wurde, denn schon DAVIES et al. (1978) und BRAUN et al. (1980) beschrieben bei größeren Mengen der Inhibin-haltigen Substanz eine Wirkungsumkehr. Die eingesetzte Substratmenge scheint demnach ein wesentlicher Faktor beim Nachweis der Inhibinwirkung im Seminalplasma zu sein, vielleicht bedingt durch die unterschiedlichen Ejakulatgrößen der einzelnen Spezies. Auch MIYAMOTO et al. (1985) konnten beim vergleichenden Einsatz von Fraktionen aus Bullen-, Eber- und Ziegenseminalplasma in vivo und in vitro beim Eber keinen einheitlichen Effekt in den beiden Bioassay-Systemen finden und führten dies auf das große Ejakulatvolumen dieser Tierart zurück.

Über eine stimulierte LH-Freisetzung in vitro durch Seminalplasma liegen keine Angaben vor. In der einzigen Arbeit über den Einsatz von Seminalplasma in der ovinen HVL-Zellkultur berichten GRAY et al. (1984) von einem LH-hemmenden Effekt des hSP. Er wurde durch 3-stündige Inkubation verschiedener hSP-Fraktionen mit 7 Tage lang vorinkubierten und GnRH-stimulierten Zellen erzielt. FSH wurde nicht gemessen.

Die Bestimmung des LH-Gehaltes im Kulturmedium erfolgte, um bei einer eventuellen FSH-Senkung Rückschlüsse auf einen physiologischen oder toxischen Effekt ziehen zu können. Denn nur in Verbindung mit einem unveränderten oder erhöhten LH- und/oder Prolaktinspiegel ist der selektiv FSH-hemmende Charakter einer Substanz belegt.

Die beschriebenen Parallelen hinsichtlich der Wirkung von Seminalplasma und Follikelflüssigkeit auf die LH-Freisetzung in vitro lassen vermuten, daß in beiden Körpersubstanzen der gleiche LH-stimulierende Faktor enthalten ist. Beim Einsatz von Seminalplasma bewirkte nur die kohleextrahierte Fraktion, mit Ausnahme des hSP, eine LH-Zunahme, so daß auch hier an ein Zusammenspiel der gonadalen Steroidhormone mit der die LH-Sekretion steigernden Komponente gedacht werden muß.

Weitere detaillierte Untersuchungen über den Einfluß von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma auf die Gonadotropinsekretion oviner HVL-Zellkulturen, z.B. hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Relation oder der Wirkung im GnRH-stimulierten System, sind notwendig, um die in diesen Screening-Versuchen gemachten Beobachtungen zu verdeutlichen. Dabei ist es sicher von Interesse, die LH-Sekretion mehr als einen modulierbaren Faktor und nicht nur als Kontrolle der Inhibin-Wirkung zu betrachten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Einfluß von GnRH sowie von Follikelflüssigkeit und Seminalplasma von Rind, Pferd, Schwein, Schaf und Mensch auf die FSH- und LH-Sekretion boviner und oviner HVL-Zellen in vitro untersucht.

Im bovinen System wurden die Follikelflüssigkeiten und Seminalplasmen nach Kohleextraktion zur Entfernung der Steroidhormone eingesetzt, während sie im ovinen System sowohl unbehandelt als auch nach Kohleextraktion zur Anwendung kamen.

Es gelang nicht, die bovine Zellkultur so zu standardisieren, daß eventuelle Modulationen der basalen und GnRH-stimulierten Gonadotropinfreisetzung beurteilt werden konnten.

In der ovinen HVL-Zellkultur wurde nur die Wirkung der Testsubstanzen auf die Basalsekretion überprüft.

Alle Follikelflüssigkeiten führten zumindest tendenziell zu einer dosisabhängigen Hemmung der FSH-Freisetzung. Es bestand kein Unterschied in der Wirkung von ungereinigter und gereinigter Follikelflüssigkeit.

Die LH-Sekretion wurde durch ungereinigte Follikelflüssigkeit nicht verändert. Nach der Kohleextraktion führten die Follikelflüssigkeiten von Rind, Pferd, Schaf und Mensch zu einer Stimula-

tion der LH-Freisetzung. Die Zugabe von gereinigter porciner Follikelflüssigkeit bewirkte einen geringgradigen LH-Anstieg.

Der LH-steigernde Effekt gereinigter Follikelflüssigkeit in der nicht GnRH-stimulierten ovinen HVL-Zellkultur wird auf einen Faktor zurückgeführt, der die LH-Sekretion stimuliert und derart mit den Steroidhormonen interagiert, daß er in der ungereinigten Follikelflüssigkeit nicht zur Wirkung kommt.

Beim Einsatz von Seminalplasma war nur bei Bulle und Mensch eine FSH-Hemmung zu beobachten. Die LH-Sekretion wurde durch die kohleextrahierten Fraktionen von allen untersuchten Spezies und durch natives humanes Seminalplasma erhöht. Die Parallelen der Ergebnisse durch Follikelflüssigkeit und Seminalplasma wurden mit dem Vorhandensein der gleichen Wirkungsmechanismen in den beiden Körperflüssigkeiten interpretiert.

6. SUMMARY

EFFECTS OF FOLLICULAR FLUID AND SEMINAL PLASMA FROM VARIOUS SPECIES ON THE FSH- AND LH-RELEASE FROM BOVINE AND OVINE ANTERIOR PITUITARY CELL CULTURES.

The influence of GnRH as well as follicular fluid and seminal plasma from cattle, horse, pig, sheep and man on the FSH- and LH-secretion in bovine and ovine anterior pituitary cell cultures was examined. In the bovine culture system the follicular fluid and the seminal plasma were used after charcoal-extraction to remove the steroidal hormones. All substances were used as well untreated as charcoal-extracted in the ovine culture system.

It was not possible to standardize the bovine cell culture system. Therefore, the modulation of the basal and GnRH-stimulated Gonadotropin-secretion could not be interpreted.

In the ovine pituitary cell culture only the effect of test substances on basal secretion was examined.

A decrease of FSH-secretion was caused by follicular fluid from all species. There was no significant difference between untreated or charcoal-extracted follicular fluid.

LH-secretion was not changed by untreated follicular fluid. Charcoal-treated follicular fluid from cattle, horse, sheep and man

stimulated LH-secretion considerably, whereas charcoal-extracted porcine follicular fluid caused a slight increase only.

The effect of increased LH-secretion by steroid-free follicular fluid in an ovine pituitary cell culture not stimulated by GnRH is described for the first time. It was already observed that the release of LH can be increased by follicular fluid. Therefore it is assumed, that the follicular fluid contains a factor which stimulates the LH secretion and interacts with the steroids so that its function becomes negated in untreated follicular fluid.

Only seminal plasma from bull and man decreased FSH-secretion. LH-release was stimulated by charcoal-extracted fractions from all species and native human seminal plasma. The parallels seen in the results obtained from follicular fluid or seminal plasma are possibly due to the same factors existing in both fluids.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- AL-OBAIDI, S.A.R., B.M. BINDON, M.A. HILLARD, T. O'SHEA and L.R. PIPER (1984):
Depression of FSH in ovariectomized ewes by bovine follicular fluid: neutralization by serum from ewes immunized against partially purified bovine inhibin.
In: Proceedings of the sixteenth Annual Conference of the Australian Society for Reproductive Biology. Melbourne, Australia, 26-29 August 1984, Paper No. 17
- ANDERSEN, M.M., J. KRØLL, A.G. BYSKOV and M. FABER (1976):
Protein composition in the fluid of individual bovine follicles.
J.Reprod.Fert. 48, 109-118
- AU, C.L., D.M. ROBERTSON and D.M. DE KRETZER (1985):
Effects of hypophysectomy and subsequent FSH and testosterone treatment on inhibin production by adult rat testis.
J.Endocr. 105(1), 1-6
- AU, C.L., D.M. ROBERTSON and D.M. DE KRETZER (1984):
Relationship between testicular inhibin content and serum FSH concentrations in rats after bilateral efferent duct ligation.
J.Reprod.Fert. 72(2), 351-356
- BAKER, H.W.G., J. BEIRNE, L.W. EDDIE, B. HUDSON, H.D. NIALL and C. SOUTHWELL (1984):
Inhibin and its receptors.
in: Hormone receptors in growth and reproduction, p. 249-256, Raven Press, New York
- BAKER, H.W.G., H.G. BURGER, D.M. DE KRETZER, L.W. EDDIE, R.E. HIGGINSON, B. HUDSON and V.W.K. LEE (1978):
Studies on purification of inhibin from ovine testicular secretions using an in vitro bioassay.
Int.J.Androl., Suppl. 2, 115-124
- BAKER, H.W.G., W.J. BREMNER, H.G. BURGER, D.M. DE KRETZER, A. DULMANIS, L.W. EDDIE, B. HUDSON, E.J. KEOGH, V.W.K. LEE and G.C. RENNIE (1976):
Testicular control of follicle-stimulating hormone secretion.
Rec.Progr.Horm.Res. 32, 429-468
- BAMBERG, E., H.S. CHOI, N.K. HASSAAN, W.J. KLÄRING, E. MÖSTL und W. STÖCKL (1980):
Steroidhormongehalt in Blut und Ovarfollikeln des Rindes während des Zyklus.
Zbl.Vet.Med.A 27, 186-194

- BANDIVDEKAR, A.H., A.M. VARADKAR and A.R. SHETH (1985):
Endocrine control of inhibin biosynthesis by human placenta.
Biol.Res.Pregnancy Perinatology 6(3), 128-132
- BARRACLOUGH, C.A., P.M. WISE, J. TURGEON, D. SHANDER, L. DE PAOLO
and N. RANCE (1979):
Recent studies on the regulation of pituitary LH and FSH secretion.
Biol.Reprod. 20, 86-97
- BEKSAC, M.S., S.A. KHAN, R. ELIASSON, N.F. SKAKKEBAEK, A.R. SHETH
and E. DICZFALUSY (1984):
Evidence for the prostatic origin of immunoreactive inhibin-like
material in human seminal plasma.
Int.J.Androl. 7, 389-397
- BELLABARA, G.A. DE, W. BISHOP and F.J. ROJAS (1984):
Inhibition of in vitro human chorionic gonadotrophin-stimulated
testosterone production in testis and of ovulation in the rat by
charcoal-treated rat testicular extract.
Life Sciences 34(3), 273-278
- BERGFELT, D.R. and O.J. GINTHER (1985):
Delayed follicular development and following inhibition of FSH
with equine follicular fluid in the mare.
Theriogenology 24(1), 99-108
- BLANC, M.R., C. CAHOREAU, M. COUROT, J.L. DACHEUX, M.T. HOCHÉ-
RAUDE-REVIERS and C. PISSELETT (1978):
Plasma follicle stimulating hormone (FSH) and lutenizing hormone
(LH) suppression in the cryptorchid ram by a non-steroid factor
(inhibin) from ram rete testis fluid.
Int.J.Androl., Suppl. 2, 139-146
- BOLT, D.J. (1986):
persönliche Mitteilung
- BOLT, D.J., G.H. KIRACOFÉ, K.F. MILLER and H.D. GUTHRIE (1985):
Potency of inhibin-like activity in bovine and porcine follicular
fluid compared in ovariectomized ewes and gilts.
J.Anim.Sci. 61, Suppl. 1, 370-371
- BOLT, D.J. and R. ROLLINS (1983):
Development and application of a Radioimmunoassay for bovine Fol-
licle-stimulating Hormone.
J.Anim.Sci. 56(1), 146-154
- BRAUN, U. (1984):
persönliche Mitteilung

- BRAUN, U., D. SCHAMS, G. BUCK und W. LEIDL (1983 a):
Verlauf der FSH- und LH-Blutplasmakonzentration und Zykluslänge
beim Rind nach Applikation von boviner Follikel- und Zystenflüssigkeit.
Zuchthyg. 18, 131-139
- BRAUN, U., D. SCHAMS and W. LEIDL (1983 b):
Effects of progesteron and estradiol-17 β on LH and FSH release
from bovine anterior pituitary cell cultures.
Acta Endocr.(Kbh.) 102, Suppl. 253, 45-46
- BRAUN, U., D. SCHAMS und W. LEIDL (1983 c):
Bovine HVL-Zellkulturen als Modell für die Untersuchung von boviner
Follikel- und Zystenflüssigkeit auf Inhibinaktivität.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 96, 197-202
- BRAUN, U., D. SCHAMS, I. RÜSSE und W. LEIDL (1980):
Einfluß der ein- und beidseitigen Ovariectomie sowie der Injektion
von Inhibin-Rohextrakt aus Bullenseminalplasma auf den Verlauf
der FSH- und LH-Blutplasmakonzentrationen beim Rind.
Zuchthyg. 15, 154-161
- BRUNNER, M.A., L.E. DONALDSON and W. HANSEL (1969):
Exogenous hormones and luteal function in hysterectomized and intact
heifers.
J.Dairy Sci. 52, 1849-1854
- CARSON, R.S., J.K. FINDLAY, I.J. CLARKE and H.G. BURGER (1981):
Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular
fluid during growth and atresia of ovarian follicles.
Biol.Reprod. 24, 105-113
- CHA, K.-Y., R.B. BARNES, R.P. MARRS and R.A. LOBB (1986):
Correlation of the bioactivity of luteinizing hormone in follicular
fluid with oocyte maturity in the spontaneous cycle.
Fert.Steril. 45, 338-341
- CHANNING, C.P., M. CHACON, K. TANABE, P. GAGLIANO and T. TILDON
(1984):
Follicular fluid inhibin activity and steroid levels in ovarian
tissue obtained at autopsy from human infants from 18 to 200 days
of age.
Fert.Steril. 42(6), 861-869
- CHANNING, C.P., L.D. ANDERSON, D.J. HOOVER, J. KOLENA, K.G.
OSTEEN, S.H. POMERANTZ and K. TANABE (1982):
The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular
maturation.
Recent Progr.Horm.Res. 38, 331-408

CHANNING, C.P., L.D. ANDERSON, D.J. HOOVER, P. GAGLIANO and G. HODGEN (1981 a):

Inhibitory effects of porcine follicular fluid on monkey serum FSH levels and follicular maturation.

Biol.Reprod. 25, 885-903

CHANNING, C.P., S.K. BATTA, W. CONDON, V.K. GANJAM and R.M. KENNEY (1981 b):

Levels of inhibin activity and an atretogenic factor(s) in follicular fluid harvested from viable and atretic mare follicles.

In: "Dynamics of Ovarian Function", N.B Schwartz and M. Hunziker-Dunn, EDS., 73-78, Raven Press, New York

CHANNING, C.P., P. GAGLIANO, D.J. HOOVER, K. TANABE, S.K. BATTA, J. SULEWSKI and P. LEBECH (1981 c):

Relationship between human follicular fluid Inhibin F activity and steroid content.

J.Cli.Endocrinol.Metab. 52(6), 1193-1198

CHAPPEL, S.C., J.A. HOLT and H.G. SPIES (1980):

Inhibin: differences in bioactivity within human follicular fluid in the follicular and luteal stages of menstrual cycle.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 163, 310-314

CHAPPEL, S.C. and C.A. BARRACLOUGH (1977):

Further studies on the regulation of FSH-secretion.

Endocrinology 101, 24-31

CHARI, S., C.R.N. HOPKINSON, E. DAUME and G.STURM (1979):

Purification of "inhibin" from human ovarian follicular fluid.

Acta Endocr. (Kbh.) 90, 157-166

CHARI, S., S. DURAI SWAMI and P. FRANCHIMONT (1978):

Isolation and characterization of inhibin from bull seminal plasma.

Acta Endocr. (Kbh.) 87, 434-448

CHARI, S., S. DURAI SWAMI and P. FRANCHIMONT (1976):

A convenient and rapid bioassay for inhibin.

Hormone Res. 7, 129-137

CONDON, T.P., E.R. LEIPHEIMER and J.J. CURRY (1984):

Preliminary evidence for a CNS site of action for ovarian inhibin.

Life Sci. 32(15), 1691-1698

CROZE, F. and P. FRANCHIMONT (1984):

Biological determination of inhibin in rat ovarian cell culture medium.

J.Reprod.Fert. 72, 237-248

- CUMMINS, L.J., T. O'SHEA, S.A.R. AL-OBAIDI, B.M. BINDON and J.K. FINDLAY (1986):
Increase in ovulation rate after immunization of Merino ewes with a fraction of bovine follicular fluid containing inhibin activity.
J.Reprod.Fert. 77, 365-372
- CUMMINS, L.J., T. O'SHEA, B.M. BINDON, V.W. LEE and J.K. FINDLAY (1983):
Ovarian inhibin content and sensitivity to inhibin in Booroola and control strain Merino ewes.
J.Reprod.Fert. 67, 1-7
- DAUME, E., S. CHARI, C.R.N. HOPKINSON, G. STURM and C. HIRSCHHÄUSER (1978):
Nachweis von Inhibin-Aktivität in der Follikelflüssigkeit menschlicher Ovarien.
Klin.Wsch. 56, 369-370
- DAVIES, R.V., S.J. MAIN and B.P. SETCHELL (1978):
Inhibin: Evidence for its existence, methods of bioassay and nature of the active material.
J.Androl. Suppl. 2, 102-114
- DE GREEF, W.J., F.H. DE JONG, J. DE KONING, J. STEENBERGEN and P.D.M. VAN DER VAART (1983):
Studies on the mechanism of the selective suppression of plasma-levels of follicle-stimulating hormone in the female rat after administration of steroid-free bovine follicular fluid.
J.Endocr. 97, 327-338
- DE JONG, F.H. and D.M. ROBERTSON (1985):
Inhibin: 1985 update on action and purification.
Molec.cell Endocr. 42, 95-103
- DE JONG, F.H., S.D. SMITH and H.J. VAN DER MOLEN (1979 a):
Bioassay of inhibin-like activity using pituitary cells in vitro.
J.Endocr. 80, 91-102
- DE JONG, F.H., R. WELSCHEN, W.P. HERMANS, S.D. SMITH and H.J. VAN DER MOLEN (1979 b):
Effects of factors from ovarian follicular fluid and sertoli cell culture medium on in vivo and in vitro release of pituitary gonadotrophins in the rat: An evaluation of systems for the assay of inhibin.
J.Reprod.Fert. Suppl. 26, 47-59
- DE JONG, F.H., R. WELSCHEN, W.P. HERMANS, S.D. SMITH and H.J. VAN DER MOLEN (1978):
Effects of testicular and ovarian inhibin-like activity, using in vitro and in vivo systems.
Int.J.Androl. Suppl. 2, 125-138

- DE JONG, F.H. and R.M. SHARPE (1976):
Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid.
Nature, Lond. 263, 71-72
- DE PAOLO, L.V., P.M. WISE, C.D. ANDERSON, C.A. BARRACLOUGH and
C.P. CHANNING (1979):
Suppression of the pituitary follicle-stimulating hormone secretion site of action.
Endocrinology 104, 402-408
- DIELEMAN, S.J., T.A.M. KRUIP, P. FONTIJNE, W.H.R. DE JONG and
G.C. VAN DER WEYDEN (1983):
Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone.
J.Endocr. 97, 31-42
- DONALDSON, L.E. and W. HANSEL (1965):
Prolongation of the life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone.
J.Dairy Sci. 48, 331-337
- DORRINGTON, J.H. and D.T. ARMSTRONG (1979):
Effects of FSH on gonadal functions.
Recent Progr.Horm.Res. 35, 301-333
- EDDIE, L.W., H.W.G. BAKER, R.E. HIGGINSON and B. HUDSON (1982):
Gonadotrophin releasing hormone causes a biphasic secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by cultures of rat anterior pituitary cells.
Acta Endocr. (Kbh.) 99, 44-49
- EDDIE, L.W., H.W.G. BAKER, R.E. HIGGINSON and B. HUDSON (1979):
A bioassay for inhibin using pituitary cell culture.
J.Endocr. 81, 49-60
- ERICKSON, G.F. and A.J.W. HSUCH (1978):
Secretion of inhibin by rat granulosa cells in vitro.
Endocrinology 103, 1960-1963
- EVANS, M.J., R.J. LOY, T.B. TAYLOR and S.P. BARROWS (1981):
Administration of steroid-free equine follicular fluid (FF) to cyclic mares; FSH response to exogenous GnRH.
J.Anim.Sci 53, Suppl. I, abstr. 464
- FINDLAY, J.K., C.G. TSONIS, L.D. STAPLES and R.N.P. CAHILL (1986):
Inhibin secretion by the sheep.
J.Reprod.Fert. 76, 751-761

FRANCHIMONT, P., A. DEMOULIN, J. VERSTRAELEN-PROYARD, M.T. HAZEE-HAGELSTEIN, J.S. WALTON and G.M.H. WAITES (1978):
Nature and mechanism of action of inhibin: perspective in regulation of male fertility.
Int.J.Androl. Suppl. 2, 69-80

FRANCHIMONT, P., S. CHARI, M.T. HAZEE-HAGELSTEIN, M.L. DEBRUCHE and S. DURAISWAMI (1977):
Evidence for the existence of inhibin.
In: "The testis in normal and infertile men", P. Troen and H.R. Nankin, Eds., Raven Press, New York

FRANCHIMONT, P., S. CHARI, M.T. HAGELSTEIN and S. DURAISWAMI (1975):
Existence of a follicle stimulating hormone inhibiting factor "inhibin" in bull seminal plasma.
Nature, Lond. 257, 402-404

FUJII, T., D.J. HOOVER and C.P. CHANNING (1983):
Changes in inhibin activity, and progesterone, oestrogen and androstenedione concentrations, in rat follicular fluid throughout the oestrous cycle.
J.Reprod.Fert. 69, 307-314

GOODMAN, A.L. (1984):
In vitro evidence of a role for inhibin in female rabbits.
Americ.J.Physiol. 246, E 243-E 248

GRAY, L.P., D.R. FRANKEN, S. GROBLER, G.M. POTGIETER, C.F. SLABBER and C. TOBLER (1984):
The effect of seminal plasma on gonadotrophin secretion by sheep pituitary cells in culture.
Andrologia 16(5), 482-485

HANSEL, W., P.W. CONCANNON and J.H. LUKASZEWSKA (1973):
Corpora lutea of large domestic animals.
Biol.Reprod. 8, 222-245

HENDERSON, K.M., M D. PRISK, N. HUDSON, K. BALL, K.P. MC NATTY, S. LUN, D. HEATH, L. E. KIEBOOM and J. MC DIARMID (1986):
Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep.
J.Reprod.Fert. 76, 623-635

HENDERSON, K.M., K.P. MC NATTY, S. LUN, D. HEATH, P. FRANCHIMONT, M.J. LECOMTE-YERNA and C. CHARLET-RENARD (1985):
Factors regulating ovarian inhibin production.
In: New Zealand, Ministry of Agriculture and Fisheries. Agricultural Research Division. Annual Report. 1983/84. Wellington, New Zealand, 198

- HENDERSON, K.M. and P. FRANCHIMONT (1983):
Inhibin production by bovine ovarian tissues in vitro and its regulation by androgens.
J.Reprod.Fert. 67, 291-298
- HERMANS, P., M.H.M. DEBETS, E.C.M. VAN LEEUWEN and F.H. DE JONG (1981):
Time related secretion of gonadotrophins after a single injection of steroid-free bovine follicular fluid in prepubertal and adult female rats.
J.Endocr. 90, 69-79
- HIRSHFIELD, A.N. (1981):
Role of FSH in the selection of ovulatory follicles.
In: "Dynamics of Ovarian Function", N.B. Schwartz and M. Hunziker-Dunn, Eds., Raven Press, New York
- HOFFMANN, B. (1972):
Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind: Entwicklung von Meßverfahren und physiologische Daten.
Vet.med.Habil., München-Weihenstephan
- HOFFMANN, J.C., J.R. LORENZEN, T.WELL and N.B. SCHWARTZ (1979):
Selective suppression of the primary surge of follicle-stimulating hormone in the rat: Further evidence for folliculostatin in porcine fluid.
Endocrinology 105, 200-203
- HUANG, E.S.R. and W.L. MILLER (1984):
Porcine ovarian inhibin preparations sensitize cultured ovine gonadotrophs to luteinizing hormone-releasing hormone.
Endocrinology 115(2), 513-519
- HUANG, E.S.R. and MILLER, W.L. (1980):
Effects of estradiol-17 β on basal and luteinizing hormone releasing hormone-induced secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture.
Biol.Reprod. 23, 124-134
- HUDSON, B., H.W.G. BAKER, L.W. EDDIE, R.E. HIGGINSON, H.G. BURGER, D.M. DE KRETZER, M. DOBOS and V.W.K. LEE (1979):
Bioassays for inhibin: a critical review.
J.Reprod.Fertil. Suppl. 26, 17-29
- IRELAND, J.J., A.D. CURATO and J. WILSON (1983):
Effect of charcoal-treated bovine follicular fluid on secretion of LH and FSH in ovariectomized heifers.
J.Anim.Sci. 57, 1512-1516

- JENNER, A.A.J., J. DE KONING and G.P. VAN REES (1982):
Time course of inhibition of synthesis and basal release of FSH from pituitary glands of female rats by bovine follicular fluid in vitro.
Acta Endocr. 101, 501-506
- JOHNSON, S.K. and M.F. SMITH (1985):
Effects of charcoal-treated, bovine follicular fluid on gonadotrophin concentrations, the onset of estrus and luteal function.
J.Animal Sci. 61, 203-209
- KARG, H., T. GIMENEZ, M. HARTL, B. HOFFMANN, E. SCHALLENBERGER and D. SCHAMS (1977):
Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in peripheral plasma of bulls: Levels from birth through puberty and short term variations.
Zbl.Vet.Med. 23 A, 793-803
- KOITER, T.R., G.C.J. VAN DER SCHAF-VERDONK, H. KUIPER, N. POLS-VALKHOF and G.A. SCHUILING (1983):
Control of follicle-stimulating hormone secretion by steroid-free bovine follicular fluid in the ovariectomized rat.
J.Endocr. 99, 1-8
- KOLB, E. (1984):
Biochemie und Pathobiochemie der Fortpflanzung.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- KRAUSE, W. (1977):
Die Regulation der FSH-Ausschüttung durch den Hoden.
Fortschr.Med. 95(18), 1207-1210
- KRUIP, T.A.M. and S.J. DIELEMAN (1985):
Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrous cycle.
Theriogenology 24(4), 395-408
- LABRIE, F., L. LAGACE, L. FERLAND, P.A. KELLY, J. DRONIN, J. MAS-SICOTTE, C. BONNE, J.-P. RAYNAUD and J.H. DORRINGTON (1978):
Interactions between LH-RH, sex steroids and "inhibin" in the control of LH and FSH secretion.
Int.J.Androl, Suppl. 2, 81-101
- LEE, V.W.K. and W.R. GIBSON (1985):
Ovulation rate and inhibin levels in gonadotrophin-treated mice.
Aust.J.Biol.Sci. 38, 115-120
- LEE, V.W.K., N. COLVIN, J. MC MASTER and H. QUIGG (1984 a):
Control of inhibin secretion by rat granulosa cells in vitro.
In: Proceedings of the sixteenth Annual Conference of the Australian Society for Reproductive Biology. Melbourne, Australia, 26-29 August 1984, Paper No. 20

- LEE, V.W.K., J. MC MASTER, N. COLVIN and H. QUIGG (1984 b):
Ovarian and circulating inhibin levels during sexual development
of the female rat.
In: Proceedings of the sixteenth Annual Conference of the Australian Society for Reproductive Biology. Melbourne, Australia, 26-29 August 1984, Paper No. 19
- LEFEVRE, B., Z. KRAIEM, Y. EPSTEIN, B. LUNENFELD, A. GAUGEON, A. THEBAULT, O. BROMSEL-EHLMREICH, R. FRYDMAN, E. PAPERNIK, D. SALTARELLI, S. BRAILLY and E. MILGROM (1981):
Inhibin-like activity and steroid content in human follicular fluid during the preovulatory period.
Int.J.Fert. 26(4), 295-296
- LING, N., S.-Y. YING, N. UENO, S. SHIMASAKI, F. ESCH, M. HOTTA and R. GUILLEMIN (1986):
Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin.
Nature 321, 779-782
- LING, N., S.-Y. Ying, N. UENO, F. ESCH, L. DENORROY and R. GUILLEMAN (1985):
Isolation and partial characterization of an MG 32.000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid.
Proc.natn Acad.Sci.U.S.A. 82, 7217-7221
- LIU, L., J. BOOTH, G.R. MERRIAM, K.M. BARNES, R.J. SHERINS, D.L. LORIAUX and G.B. CUTLER, JR. (1985):
Evidence that 31-amino acid inhibin-like peptide lacks inhibin activity.
Endocr.Res. 11(3-4), 191-197
- LORENZEN, J.R., C.P. CHANNING and N.B. SCHWARTZ (1978):
Partial characterization of FSH suppressing activity (folliculo-statin) in porcine follicular fluid using the metestrous rat as an in vivo bioassay model.
Biol.Reprod. 19, 196-205
- LUGARO, G., M.M. CASSELLATO, G. MAZZOLA, G. FACHINI and G. CARREA (1974):
Evidence for the existence in spermatozoa of a factor inhibiting hormone synthesis.
Neuroendocr. 15, 62-68
- LUMPKIN, M., A. NEGRO-VILAR, P. FRANCHIMONT and S. MC CANN (1981):
Evidence for a hypothalamic site of action of inhibin to suppress FSH release.
Endocrinology 108, 1101-1104

MANNS, J.G. and G.D. NISWENDER (1983):
FSH receptors in the bovine corpus luteum.
J.Anim.Sci. 57 (Suppl. 1), Abstr. 536

MARDER, M.L., C.P. CHANNING and N.B. SCHWARTZ (1977):
Suppression of serum follicle-stimulating hormone in intact and
actually ovariectomized rats by porcine follicular fluid.
Endocrinology 101, 1639-1642

MARTIN, M.J., T.C. CANTLEY and B.N. DAY (1984):
The effects of charcoal-treated porcine follicular fluid on plas-
ma concentrations of FSH and LH in ovariectomized gilts.
J.Anim.Sci. 59 (Suppl. 1), Abstr. 527

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974):
Virologische Arbeitsmethoden, Band I.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

MC CULLAGH, D.R. (1932):
Dual endocrine activity of the testis.
Science 76, 19-20

MC NATTY, K.P., M. GIBB, C. DOBSON, D.C. THURLEY and J.K. FINDLAY
(1981):
Changes in the concentration of gonadotrophic and steroidal hor-
mones in the antral fluid of ovarian follicles throughout the oe-
strous cycle of the sheep.
Aust.J.Biol.Sci. 34, 67-80

MC NEILLY, A.S. (1984):
Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay
in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular
fluid.
J.Reprod.Fert. 72, 165-172

MEANS, A.R., J.L. FAKUNDING, C. HUCKINS, D.J. TINDALL and R. VI-
TALE (1976):
Follicle-stimulating hormone, the sertoli cell, and spermatogene-
sis.
Rec.Progr.Horm.Res. 32, 477-522

MEINECKE, B., H. GIPS and S. MEINECKE-TILLMANN (1984):
Zur Dynamik der präovulatorischen intrafollikulären Steroidhor-
moninkretion beim Schwein.
Zuchthyg. 19, 193-204

MILLER, K.F. and D.J. BOLT (1985 a):
Basal and GnRH induced secretion of FSH and LH in ovariectomized
ewes treated with bovine follicular fluid.
Domestic Anim.Endocr. 2(4), 197-206

- MILLER, K.F. and D.J. BOLT (1985 b):
Treatment of ovariectomized ewes with bovine follicular fluid decreases secretion of FSH without changing secretion of LH.
Theriogenology 24(2), 211-216
- MILLER, K.F., J.K. CRITSER and O.J. GINTHER (1982):
Inhibition and subsequent rebound of FSH secretion following treatment with bovine follicular fluid in the ewe.
Theriogenology 18, 45-53
- MILLER, K.F., J.A. WESSON and O.J. GINTHER (1981):
Interaction of estradiol and a nonsteroidal follicular fluid substance in the regulation of gonadotrophin secretion in the mare.
Biol.Reprod. 24, 354-358
- MILLER, K.F., J.K. CRITSER, R.F. ROWE and O.J. GINTHER (1979 a):
Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle.
Biol.Reprod. 21, 537-544
- MILLER, K.F., J.A. WESSON and O.J. GINTHER (1979 b):
Changes in concentrations of circulating gonadotrophins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares.
Biol.Reprod. 21, 867-872
- MILLER, W.L., M.M. KNIGHT, H.J. GRIMEK and J. GORSKI (1977):
Estrogen regulation of follicle stimulating hormone in cell cultures of sheep pituitaries.
Endocrinology 100(3), 1306-1316
- MIYAMOTO, K., Y. HASEGAWA, M. FUKUDA, M. NOMURA, M. IGARASHI, K. KANGAWA and H. MATSUO (1985 a):
Isolation of porcine FF inhibin of 32 K Daltons.
Biochem.biophys.Res.Comm. 129(2), 396-403
- MIYAMOTO, A., M. UMEZU and J. MASAKI (1985 b):
Inhibin-like substance in goat testicular extracts and seminal plasma.
Jap.J.Zootech.Sci. 56(3), 226-233
- MIYAMOTO, A., M. UMEZU and J. MASAKI (1985 c):
Comparative activity of inhibin-like materials in bovine, goat and porcine seminal plasma and bovine follicular fluid.
Jap.J.Zootech.Sci. 56(5), 399-406
- MOHAPATRA, S.K., S. DURAISWAMI and S. CHARI (1985).
On the identity of bovine seminal plasma inhibin.
Molec.cell.Endocr. 41(213), 187-196

MOTTRAM, J.C. and W. CRAMER (1923):

On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumor growth in the rat and the special effects on testis and pituitary.

Q.J.Exp.Pysiol. 13, 209-229

NISWENDER, G.D., L.E. REICHERT, A.R. MIDGLEY, JR. and A.V. NALBANDOV (1969):

Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. Endocrinology 84, 1166-1173

ODELL, W.D., R.S. SWERDLOFF, H.S. JACOBS and M.A. HESCOX (1973): FSH-induction of sensitivity to LH: one cause of sexual maturation in the male rat.

Endocrinology 92, 160-165

PADMANABHAN, V., E.M. CONVEY, J.F. ROCHE and J.J. IRELAND (1984):

Changes in inhibin-like bioactivity in ovulatory and atretic follicles and utero-ovarian venous blood after prostaglandin-induced luteolysis in heifers.

Endocrinology 115(4), 1332-1340

PEEK, J.C. and W.B. WATKINS (1979):

Gonadotrophin-inhibiting activity in seminal plasma from intact and vasectomized bulls.

J.Reprod.Fert. 57, 281-285

QUIRK, S.M. and J.E. FORTUNE (1986):

Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers.

J.Reprod.Fert. 76, 609-621

RAMASHARMA, K., M.R. SAIRAM, N.G. SEIDAH, M. CHRETIEN, P. MANJUNATH and P.W. SCHILLER (1984):

Isolation, structure and synthesis of a human seminal plasma peptide with inhibin-like activity.

Science 223, 1199-1202

REDMER, D.A., R.K. CHRISTENSON, J.J. FORD and B.N. DAY (1985):

Effect of follicular fluid treatment on follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and compensatory ovarian hypertrophy in prepubertal gilts.

Biol.Reprod. 32, 111-119

ROBERTSON, D.M., F.L. DE VOS, L.M. FOULDS, R.I. MC LACHLAN, H.G. BURGER, F.J. MORGAN, M.T.W. HEARN and D.M. DE KRETZER (1986 a):

Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid.

Molec.cell.Endocr. 44, 271-277

ROBERTSON, D.M., M.S. GIACOMETTO and D.M. DE KRETZER (1986 b):
The effects of inhibin purified from bovine follicular fluid in
several in vitro pituitary cell culture systems.
Molec.cell.Endocr. 46, 29-36

ROBERTSON, D.M., L.M. FOULDS, L. LEVERSHA, F.J. MORGAN, M.T.W.
HEARN, H.G. BURGER, R.E.H. WETTENHALL and D.M. DE KRETZER
(1985):
Isolation from inhibin from bovine follicular fluid.
Biochem.biophys.Res.Comm. 126, 220-226

ROBINSON, T.J. (1977):
Reproduction in cattle.
In: "Reproduction in domestic animals", Cole, H.H. and P.T.
Cups, Eds., Academic Press, New York

RUSH, M.E. and H. LIPNER (1979):
Blockade of gonadotrophin-releasing hormone-induced secretion of
pituitary follicle-stimulating hormone by inhibin-containing pre-
parations.
Endocrinology 105, 187-194

SAIRAM, M.R. M.R. RANGANATHAN and P. LAMOTHE (1978):
Purification and characterization of a follitropin suppressing
principle from bull ejaculate.
Biol.Reprod. 18, Abstr. 58

SANDER, H.J., E.C.M. VAN LEEUWEN and F.H. DE JONG (1984):
Inhibin-like activity in media from cultured rat granulosa cells
collected throughout the oestrous cycle.
J.Endocr. 103, 77-84

SCHALLENBERGER, E. D. SCHAMS, B. BULLERMANN and D.L. WALTERS
(1984).
Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ova-
rian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the cor-
pus luteum in cow.
J.Reprod.Fert. 71, 493-501

SCHALLY, A.V., A. ARIMURA, A.J. KASTIN, H. MATSUO, Y. BABA, T.V.
REDDING, R.M.G. NAIR and L. DEBELJUK (1971):
Gonadotrophin releasing hormone: one polypeptide regulates secre-
tion of luteinizing and follicle stimulating hormones.
Science 173, 1036-1038

SCHAMS, D. and E. SCHALLENBERGER (1976):
Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating
hormone and its application during the oestrous cycle in cattle.
Acta Endocr. (Kbh.) 81, 461-473

SCHAMS, D. und H. KARG (1969):

Radioimmunologische LH-Bestimmung im Blutserum vom Rind unter besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus.

Acta Endocr. (Kbh.) 61, 96-103

SCHWARTZ, N.B. and C.P. CHANNING (1977):

Evidence for ovarian inhibin: suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of follicular fluid.

Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 74, 5721-5724

SCOTT, R.S. and H.G. BURGER (1981):

An inverse relationship exists between seminal plasma inhibin and serum follicle stimulating hormone in man.

J.Clin.Endocr.Metab. 52, 796

SCOTT, R.S., H.G. BURGER and H. QUIGG (1980):

A simple and rapid in vitro bioassay for inhibin.

Endocrinology 107, 1536-1542

SETCHELL, B.P. and F. JACKS (1974):

Inhibin-like activity in rete testis fluid.

J. Endocr. 62, 675-676

SHANDER, D., L.D. ANDERSON, C.A. BARRAGLOUGH and C.P. CHANNING (1980):

Interactions of porcine follicular fluid with ovarian steroids and luteinizing hormone on the secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by cultured pituitary cells.

Endocrinology 106, 237-242

SHETH, A.R., G.R. VANAGE, S. VIJAYALAKSHMI, P.R. SHETH, K.A. KRISHNAN, B.S. SARVAMANGALA, S.B. MOODBIDRI, S.P. DANDEKAR, A.H.

BANDIVDEKAR and N.J. ARBATTI (1984):

Regulation of follicle-stimulating hormone action at the gonadal level.

In: "Hormone receptors in growth and reproduction", Raven Press, New York

STEELMAN, S.L. and F.M. POHLEY (1953):

Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin.

Endocrinology 53, 604-616

STEINBERGER, A. and E. STEINBERGER (1976):

FSH inhibiting factor by cultured sertoli cells.

Endocrinology 99, 918-921

STEINBERGER, E.A., A. ROOT, A. FICHER and K.D. SMITH (1973):

The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in the rat.

J.Clin.Endocrinol.Meatab. 37, 746-751

STOCK, A. (1984):

Untersuchung der Progesteronsekretion von Corpora lutea und Corpus luteum-"Zysten" beim Rind.
Vet.med.Diss., München

STOLLA, R. und B. HIMMER (1979):

Hormonelle Untersuchungen an Follikeln des Rinderovars während verschiedener Zyklusphasen.
Veterinär-Humanmed. Tagung, München, 23./24. Feb., 13-15

TANABE, K., P. GAGLIANO, C.P. CHANNING, Y. NAKAMURA, Y. YOSHIMURA, R. IIZUKA, A. PORTUNY, J. SULEWSKI and N. REZAI (1983):

Levels of inhibin-activity and steroids in human follicular fluid from normal women and women with polycystic ovarian disease.
J.Clin.Endocr.Metab. 57, 24-31

TAYA, K., J. KIMURA and S. SASAMOTO (1984):

Inhibin activity in ovarian venous plasma during pregnancy, pseudopregnancy and lactation in the rat.
Endocrinologica Japonica 31(4), 427-433

THOMAS, C.L.JR. and M.B. NIKITOVITCH-WINER (1984):

Complete suppression of plasma follicle-stimulating hormone in castrated male and female rats during continuous administration of porcine follicular fluid.
Biol.Reprod. 30, 427-433

THOMAS, P.R.M., M.A.F. MURRAY and H.S. JACOBS (1977):

Monotropic increase of follicle-stimulating hormone secretion in women with damaged ovaries - evidence for inhibin in women?
J.Endocr. 73, 24-25

TSONIS, C.G. and S. SHARPE (1986):

Dual control of follicle-stimulating hormone.
Nature, 321(6072), 724-725

TSONIS, C.G., H. QUIGG, V.W.K. LEE, L. LEVERSHA, A.O. TROUNSON and J.K. FINDLAY (1983):

Inhibin in individual ovine follicles in relation to diameter and atresia.
J.Reprod.Fert. 67, 83-90

ULTEE-VAN GESSEL, A.M., F.G. LEFMBORG, F.H. DE JONG and H.J. VAN DER MOLEN (1986):

In vitro secretion of inhibin-like activity by sertoli cells from normal and prenatally irradiated immature rats.
J.Endocr. 109, 411-418

VALE, W., J. RIVIER, J. VAUGHAN, R. MC CLINTCK, A. CORRIGAN, W. WOO, D. KARR and J. SPIESS (1986):

Purification and characterization of a FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid.
Nature, 321, 776-779

VALE, W., G. GRANT, M. AMOSS, R. BLACKWELL and R. GUILLEMIN
(1972):

Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells:
Functional validation of a method.
Endocrinology 91, 562-572

VAN DIJK, S., C. STEENBERGEN, F.H. DE JONG and H.J. VAN DER MOLEN
(1985):

Comparison between inhibin from human and bovine follicular fluid
using fast liquid chromatography.
Molec.cell.Endocr. 42, 245-251

WALLACE, J.M. and A.S. MC NEILLY (1985):

Increase in ovulation rate after treatment of ewes with bovine
follicular fluid in the luteal phase of the oestrous cycle.
J.Reprod.Fert. 73, 505-515

WEBER, E. (1972):

Grundriß der biologischen Statistik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

WELSCHEN, R. W.P. HERMANS, J. DULLAART and F.H. DE JONG (1977):

Effects of an inhibin-like factor present in bovine and porcine
follicular fluid on gonadotrophin levels in ovariectomized rats.
J.Reprod.Fert. 50, 129-131

ANHANG

LISTE DER VERWENDETEN REAGENTIEN UND GEGENSTÄNDE

- 1.) Aktivkohle Norit A, Partikelgröße 4 - 7 μ ; Nr. 30890; Fa. Serva.
- 2.) Bovines Serumalbumin (BSA), Fraction V; Nr. A-9647; Fa. Sigma.
- 3.) Buserelin^R, Trockensubstanz; Fa. Hoechst AG.
- 4.) Calciumchlorid; Nr. 2387; Fa. Merck.
- 5.) Collagenase, Worthington CCS III, 19 u/mg, 1 g; Nr. E 4182; Fa. Seromed.
- 6.) Dextran 60; Nr. 18680; Fa. Serva.
- 7.) Filter: Millipack 40, Porengröße 0,22 μ m; Fa. Millipore.
Millex Filtereinheiten, SLGS 025; Fa. Millipore.
- 8.) Fungizone, Amphotericin B, 250 mcg/ml; Nr. 061-5295; Fa. Gibco.
- 9.) Gentamycin Solution, 50 mg/ml; Nr. 043-5750 D; Fa. Gibco.
- 10.) Hank's BSS; Nr. 041-4170 M; Fa. Gibco.
- 11.) HEPES = 2- 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl -ethansulfonsäure; Nr. 10110; Fa. Merck.
- 12.) Insulin, from bovine pancreas; Nr. I-5500; Fa. Sigma.
- 13.) Kälberserum, new born calf serum; Nr. 021-6010 M; Fa. Gibco.
- 14.) Kulturschalen, multi-well-plates; Nr. 3524; Fa. Teconomara.
- 15.) Medium 199, Trockensubstanz; Nr. 071-1100 A, Fa. Gibco.
- 16.) Pankreatin; Nr. 061-5725; Fa. Gibco.
- 17.) Penicillin G, Natriumsalz, Trockensubstanz, 1000000 IE, Fa. Hoechst AG.

LEBENS LAUF

Am 3. März 1956 wurde ich als zweite von drei Töchtern des Architekten Felix Bus und der Bankangestellten Marianne Bus in Kusel/Rheinland-Pfalz geboren.

Von 1962 bis 1974 besuchte ich die Volksschule Rehweiler und das staatliche Gymnasium Kusel, an dem ich das neusprachliche Abitur ablegte.

Ab 1975 absolvierte ich die Ausbildung zur Pferdewirtin mit Schwerpunkt Reiten in Ramstein/Rheinland-Pfalz und Lehre-Essenrode/Niedersachsen, die ich im April 1978 mit der Gesellenprüfung beendete. Bis zum Oktober des gleichen Jahres war ich im Reiterverein Südtondern in Leck/Schleswig-Holstein als Bereiterin angestellt.

Mit Beginn des Wintersemesters 1978/79 studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, an der ich auch im November 1983 den dritten Teil der tierärztlichen Prüfung abschloß.

Seit März 1984 bin ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München - Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung - mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas, seine stets großzügige Unterstützung und bereitwillige Hilfestellung.

Herrn Professor Dr. D. Schams - Institut für Physiologie der Technischen Universität München/Weihenstephan - und Herrn Dr. D.J. Bolt - U.S. Departement of Agriculture, Beltsville, U.S.A. - möchte ich für die zur Verfügung gestellten Reagentien zur Durchführung der radioimmunologischen LH- und FSH-Bestimmung herzlichst danken.

Herrn Dr. Dr. habil. U. Braun - Veterinär-Medizinische Klinik der Universität Zürich - gilt mein Dank für die umsichtige Einarbeitung in die Arbeit des Zell- und Hormonlabors.

Herrn Dr. W. Kähn danke ich sehr für die Anregungen und praktischen Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. K. Sterzig - Klinikum der Universität Ulm - möchte ich für die Bereitstellung der humanen Follikelflüssigkeit meinen Dank aussprechen.

Frau B. Schüssler danke ich ganz herzlich für die bereitwillige Weitergabe ihrer Kenntnisse im medizinisch-technischen Labor.

Bei allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München möchte ich mich für die stets freundliche Unterstützung und Hilfe bedanken.

